



Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina

TESIS DOCTORAL

**FENOTIPOS Y ENDOTIPOS DE ASMA GRAVE: MECANISMOS
MOLECULARES IMPLICADOS EN LA PATOGÉNESIS Y EN LA
DESENSIBILIZACIÓN A ASPIRINA**

AUTORA: IRINA DIANA BOBOLEA

DIRECTORES DE TESIS:

Dr. SANTIAGO QUIRCE GANCEDO

Dr. RODOLFO ALVAREZ-SALA WALTHER

Lugar de presentación: Universidad Autónoma de Madrid - Facultad de Medicina

Lugar de investigación: Hospital Universitario La Paz, Madrid-Servicio de
Alergología.

MADRID 2017

FUENTES DE FINANCIACIÓN

La actividad investigadora desarrollada para llevar a cabo esta tesis doctoral fue posible gracias al Programa de formación en investigación “Río Hortega” del Instituto de Salud Carlos III/ AES 2009. Fui beneficiaria del contrato post-MIR CM09/00125, que realicé a través de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz en el Servicio de Alergología del Hospital La Paz de Madrid (04.02.2010- 03.02.2013).

El material fungible que utilizamos para este proyecto se adquirió gracias a una Beca de la Fundación SEAIC obtenida en la convocatoria 2011/2012.

Título: “Estudio clínico y molecular de la enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina”. Año inicio-Año Fin: 2012-2014. Entidad Financiadora: Fundación SEAIC. Cuantía concedida: 6.000 euros. IP: Dr. Santiago Quirce.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN:

La prevalencia de asma grave en España se estima en torno a los 80.000 pacientes; sin embargo los costes directos e indirectos del asma no controlada pueden ser hasta diez veces superiores a los del asma bien controlada. A pesar de la existencia de fármacos ampliamente disponibles y efectivos, así como de directrices uniformes de manejo, lograr y mantener el control del asma sigue siendo un desafío permanente.

El reto en el tratamiento del asma reside precisamente en su heterogeneidad. Mejorar nuestra comprensión de los mecanismos que subyacen la respuesta a uno u otro tratamiento en los pacientes con asma todavía representa una tarea pendiente.

En la última década se han realizado notables esfuerzos para identificar características y biomarcadores específicos del asma grave, que son diferentes a los descritos para el asma leve a moderada, preparando el escenario para el desarrollo de nuevos fármacos. Las opciones más prometedoras están representadas por las terapias biológicas, en particular los anticuerpos monoclonales frente a dianas selectivas, algunos ya disponibles, o bien en ensayos clínicos fase III o aprobados, pendientes de próxima comercialización.

Por ello, las guías actuales recomiendan determinar el perfil individual de alteraciones fisiopatológicas predominantes en cada paciente para prescribir el tratamiento más adecuado en cada caso. El enfoque actual y futuro para el manejo del asma debe incluir la estratificación de los pacientes según los fenotipos (clínicos, inflamatorios, funcionales, moleculares) y los endotipos descritos (asma alérgica, asma con hipersensibilidad a aspirina o EREA [enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina], asma hipereosinofílica de inicio tardío, asma no eosinofílica), con el fin de ayudar a personalizar, a individualizar, la respuesta a los diferentes tratamientos para el asma.

Desde el año 2011, la periostina se postuló como biomarcador emergente predictor del fenotipo eosinofílico y T2 alto, y de la respuesta al anticuerpo monoclonal

anti-IL 13 lebrikizumab en pacientes con asma grave. Por otro lado, un endotipo concreto de pacientes con asma grave, los EREA, son habitualmente los más difíciles de manejar, pero se pueden beneficiar de un tratamiento específico y efectivo, la desensibilización a aspirina.

Justificación del estudio:

Identificar por lo tanto el fenotipo/endotipo de asma en cada paciente, profundizar en la fisiopatología, e identificar biomarcadores específicos para cada endotipo e incluso predictores de respuesta, como podría ser la periostina, constituyen actualmente prioridades en la investigación traslacional en el asma.

Los mecanismos de la desensibilización a aspirina se conocen parcialmente, siendo mejor estudiados los metabolitos del ácido araquidónico (eicosanoides). Este tratamiento, aunque muy efectivo, es poco utilizado en la práctica clínica por su complejidad y efectos secundarios. Con lo cual aclarar los mecanismos de la desensibilización podría identificar otras dianas terapéuticas para los pacientes con EREA, postulándose los anticuerpos monoclonales anti-TSLP, actualmente en ensayos fase III, como una posible opción terapéutica futura.

Hipótesis de trabajo:

Nuestra hipótesis es que la periostina se correlaciona con los fenotipos inflamatorios y moleculares identificados en los pacientes atendidos en la consulta de Asma grave, lo que la convertiría en un biomarcador útil para orientar el tratamiento.

En pacientes desensibilizados a aspirina postulamos que la TSLP, una molécula efectora proinflamatoria, disminuye en caso de mejoría clínica, lo que apoyaría la utilidad de los nuevos fármacos anti-TSLP en la EREA.

OBJETIVOS:

1. Identificar los fenotipos inflamatorios y moleculares de los pacientes con asma grave atendidos en una Unidad interdisciplinar.

2. Investigar el papel de la periostina en esputo inducido como biomarcador de los distintos fenotipos de asma grave.
3. En el subgrupo de pacientes con asma grave endotipo EREA: profundizar el conocimiento actual sobre la patogénesis de la EREA y de la desensibilización con aspirina mediante análisis de biomarcadores en esputo inducido (eicosanoides, TSLP), pre y post- desensibilización.

PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS:

1. Para cumplir los **objetivos 1-2**, realizamos un estudio observacional prospectivo en pacientes con asma grave atendidos en la Unidad interdisciplinar del Hospital Universitario La Paz en los años 2011-2012, reclutados de forma consecutiva según criterios de inclusión/exclusión estrictos.

Material y métodos:

- Se recogieron datos demográficos y clínicos. Se clasificaron a los pacientes en distintos **fenotipos**, según una serie de variables definidas en base a la evidencia científica. Se realizó una serie de **comparaciones de variables** continuas y categóricas entre los subgrupos identificados.

- La **periostina** se midió en todos los pacientes, en los sobrenadantes de esputo inducido, y se analizó **su correlación** con parámetros clínicos, inflamatorios, de función pulmonar, y entre los distintos fenotipos.

2. En una segunda fase del estudio, con el fin de cumplir el **objetivo 3**, en el **subgrupo de pacientes diagnosticados de intolerancia a AINE (endotipo EREA)** realizamos un **estudio prospectivo intervencionista**, abierto, no controlado con placebo, para valorar la eficacia, seguridad y los mecanismos de su tratamiento específico, la desensibilización a aspirina (2012-2013).

Material y métodos:

-**Criterios de inclusión/exclusión** específicos de la desensibilización.

-Parámetros analizados: Parámetros clínicos, espirométricos, inflamatorios: se compararon antes y después de la desensibilización (al mes y a los 6 meses). Se analizó la dinámica de los marcadores de inflamación (PGD₂, PGE₂, LTC₄, TSLP) en muestras de esputo inducido en los momentos especificados arriba, y su correlación con los parámetros clínicos y de función pulmonar.

RESULTADOS:

Un total de 62 pacientes diagnosticados de asma grave refractaria siguiendo los criterios ATS se incluyeron inicialmente en el estudio. La inducción del esputo tuvo éxito en 52 pacientes (83%).Cincuenta pacientes tenían eosinofilia de esputo > 2%, de los cuales 71% eran eosinofílicos puros (36 pacientes) y 25% mixtos granulocíticos (13 pacientes). 2 pacientes resultaron no eosinofílicos: 1 paucigranulocítico y otro neutrofílico puro. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos fenotipos de asma eosinofílica (eosinofílico puro y granulocítico mixto) para todas las variables comparadas, con excepción de los niveles de periostina, como se mencionará a continuación.

Las concentraciones de los niveles de periostina en esputo medidos en las muestras de nuestros pacientes están dentro del rango de 0.1-152 ng/ml, con una **media de 53.6ng/ml**. Se encontró **una correlación positiva débil** (0,313, $p = 0,02$) entre los niveles de periostina y el porcentaje de eosinofilia en esputo en todos los pacientes del estudio, pero no entre los niveles de FeNO y los niveles de periostina (0,064; $p = 0,667$). Los niveles de periostina fueron significativamente mayores en pacientes con **fenotipo eosinofílico puro** en comparación con aquellos pacientes con fenotipo inflamatorio granulocítico mixto (61,58 [3,1-152] versus 37,31 [0,1-97] ng/ml, $p < 0,05$). Cuando se compararon los niveles de periostina entre los pacientes con eosinofilia persistente en el esputo a pesar del tratamiento con corticosteroides inhalados a dosis altas, se encontró que los niveles de periostina fueron significativamente mayores en pacientes con **limitación crónica** ($n=25$) en comparación con aquellos con limitación variable del flujo aéreo ($n=25$): (media [rango]) (69,76 [3,1-152] frente a 43,84 [0,1-117] ng / ml, $p < 0,05$). También hubo una correlación inversa entre FEV₁/FVC post-broncodilatador y periostina (-0,276, $p < 0,05$).

En el subgrupo de pacientes con asma grave endotipo EREA, tras un proceso de inclusión muy riguroso, se llevaron a cabo 14 desensibilizaciones a aspirina, con éxito en 13 pacientes, siendo una paciente con subfenotipo EREA muy grave imposible de desensibilizar. Analizamos finalmente 10 pacientes llegados a los 6 meses de desensibilización, los otros 3 por distintos motivos tuvieron que abandonar el tratamiento. Todos los pacientes toleraron sin reacciones adversas graves el procedimiento de la desensibilización seguido de toma de aspirina a diario, a dosis individualizadas en cada caso para mantener el control del asma. Todos los parámetros clínicos analizados mejoraron significativamente 1 y 6 meses después de la desensibilización. La desensibilización produjo una mejoría significativa de los síntomas inflamatorios de vías respiratorias tanto altas como bajas: mejoró el olfato, disminuyó el número de visitas a Urgencias por asma, aumentó el control y la calidad de vida para la rinitis y el asma, a partir de tan solo las 4 semanas de tratamiento, con la consiguiente reducción en los tratamientos de mantenimiento necesarios para controlar las enfermedades de base.

La PGD2 (broncoconstrictora y proinflamatoria) disminuyó significativamente (media basal $49,21 \pm 21,27$; 1 mes $27,74 \pm 17,69$ - $p < 0,01$; 6 meses $30,90 \pm 9,16$ pg / ml, $p < 0,01$ con respecto a la basal). La PGE2 (broncoprotectora) aumentó al mes y a los 6 meses ($p < 0,05$) en comparación con el valor basal (media basal $10,93 \pm 8,03$; 1 mes $18,39 \pm 54,89$; 6 meses $30,90 \pm 9,16$ pg / ml). Pero la LTC4 también aumentó ligeramente (ns) (media basal $12,11 \pm 3,86$; 1 mes $18,55 \pm 20,98$; 6 meses $34,80 \pm 31,16$ pg / ml), manteniendo así un índice LTC4 / PGE2 constante antes y después de la desensibilización.

La TSLP aumentó paradójicamente en todos los pacientes (media basal $0,1 \pm 0,05$; 1 mes $3,68 \pm 7$; 6 meses $212,3 \pm 47$ pg / ml; $p < 0,01$), a pesar de la mejoría clínica y de la función pulmonar.

CONCLUSIONES:

1. Este es el primer estudio que demuestra la asociación entre los niveles de periostina en esputo y la limitación persistente del flujo aéreo, en pacientes con asma grave y eosinofilia persistente en esputo a pesar del tratamiento con corticosteroides inhalados en dosis altas.

2. La periostina se correlaciona con la obstrucción al flujo aéreo y por tanto, de forma indirecta, con el proceso de remodelación de la vía aérea, lo que puede ser útil como aproximación pronóstica y terapéutica.
3. La desensibilización a aspirina resultó ser un procedimiento seguro y eficaz en los pacientes correctamente seleccionados.
4. El cambio global demostrado en los metabolitos del ácido araquidónico post-desensibilización se correlaciona con la mejoría clínica experimentada por los pacientes (el descenso de PGD2 sobre un fondo constante de LTC4/PGE2).
5. La TSLP aumentó 6 meses después de la desensibilización, a pesar de la mejoría clínica y de la función pulmonar. Aunque nuestros hallazgos necesitan validación en estudios más amplios, postulamos que la TSLP puede actuar no sólo como una molécula efectora, sino también como reguladora.
6. Demostramos por primera vez la implicación de la TSLP en la patogénesis de la EREA y de la desensibilización a aspirina, lo que abre nuevos caminos para investigar tanto sobre sus funciones reguladoras aparte de las efectoras ya descritas hasta la fecha, como sobre su posible papel como diana terapéutica en pacientes con EREA, dado que varios ensayos clínicos con antagonistas TSLP están en curso.

DESCRIPTORES

Asma; asma grave; desensibilización a aspirina; endotipos; EREA; fenotipos; periostina; TSLP.

ÍNDICE

Listado de Figuras.....	11
Listado de Tablas.....	12
Listado de Abreviaturas.....	13
1. INTRODUCCIÓN.....	17
1.1. Definiciones actuales.....	18
Prevalencia e Impacto socio-económico del Asma y del Asma Grave.....	19
1.2 Fisiopatología del asma.....	21
Generalidades.....	21
Fenotipos y Endotipos.....	24
Endotipo EREA: enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina.....	34
1.3. Utilidad de los Biomarcadores no invasivos en el asma.....	46
Generalidades.....	46
Espujo inducido.....	47
Periostina.....	49
TSLP.....	51
1.4. Abordaje actual del asma grave	
Abordaje "sin hipótesis previa" hacía la medicina de precisión: diagnóstico y tratamiento por feno-endotipos.....	54
Manejo integral de los pacientes con asma grave en la Unidad interdisciplinar de asma del Hospital Universitario La Paz.....	57
Manejo interdisciplinar de la EREA y la desensibilización a aspirina.....	58
1.5. Justificación e hipótesis del trabajo.....	63
2. OBJETIVOS.....	65
3. PACIENTES Y MÉTODOS.....	66
4. RESULTADOS.....	85
5. DISCUSIÓN.....	105
6. CONCLUSIONES.....	118
7. PUBLICACIONES Y PREMIOS DERIVADAS DE ESTA TESIS.....	120
BIBLIOGRAFÍA.....	124

ANEXO I. Hoja de recogida de datos Visita basal.....	137
ANEXO II. Hoja de recogida de datos Visitas sucesivas post-desensibilización...	138
ANEXO III. Protocolo detallado de la desensibilización a aspirina.....	139

LISTADO DE FIGURAS

- Figura 1. Biomarcadores de la respuesta Th-2/Th-1 en el asma. Página 23
- Figura 2. Transición de las definiciones desde fenotipos clínicos hacia fenotipos moleculares y endotipos de asma. Página 32
- Figura 3: Representación esquemática de las principales rutas de metabolización del ácido araquidónico. Página 38
- Figura 4. Papel de la periostina en el proceso patogénico de la fibrosis subepitelial. Página 51
- Figura 5. Resumen de los fenotipos identificados utilizando un análisis de *clusters* en población asmática. Página 55
- Figura 6. Abordaje global para la caracterización del paciente con asma grave. Página 56
- Figura 7. Manejo del enfermo con sospecha de EREA. Página 59
- Figura 8. Algoritmo diagnóstico general del paciente con Asma Grave/de control difícil. Página 77
- Figura 9. Evaluación sistemática del asma grave. Página 78
- Figura 10A y B. El asma de inicio tardío se correlaciona con un IMC mayor. Página 90-91
- Figura 11. El asma de inicio temprano se correlaciona con una FeNO mayor. Página 92
- Figura 12. La limitación crónica al flujo aéreo y la edad de inicio del asma. Página 93
- Figura 13. Niveles de periostina en esputo en los diferentes fenotipos de asma identificados. Página 96
- Figura 14. Resumen de las desensibilizaciones realizadas. Página 99
- Figura 15 A. Evolución de los parámetros clínicos analizados. Página 101
- Figura 15 B. Evolución de la función pulmonar, de la inflamación y de la necesidad de tratamiento. Página 102
- Figura 16. Cambios en los eicosanoides en esputo pre-post desensibilización. Página 103
- Figura 17. Aumento de la TSLP en esputo pre-post desensibilización. Página 104

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Glosario de sinónimos de enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina (EREA) empleados en la literatura médica. Página 35

Tabla 2. Los parámetros usados para la definición del endotipo EREA. Página 45

Tabla 3. Exploraciones complementarias recomendadas para el estudio de otras posibles enfermedades simuladoras de asma grave no controlada. Página 79

Tabla 4. Características demográficas, clínicas, inflamatorias y funcionales de los sujetos estudiados. Página 87

Tabla 5. Fenotipos de asma identificados. Página 89

LISTADO DE ABREVIATURAS

AA:	asma alérgica
AHEIT:	asma hipereosinofílica de inicio tardío
AINE:	Anti Inflamatorios No Esteroideos
Anti IL-13:	anticuerpo anti IL-13
AntiIgE:	anticuerpo anti IgE
ATS:	Sociedad Americana del Tórax
BAL:	lavado broncoalveolar
CI:	corticosteroides inhalados
CLCA1:	proteína inductiva de los canales de cloro y calcio
COX1:	ciclooxigenasa tipo 1
CS:	corticosteroides sistémicos
CV:	coeficiente de variación
DE:	desviación estándar
ELISA:	ensayo inmuno sorbente ligado a enzima
EPOC:	enfermedad broncopulmonar obstructiva crónica
EREA:	Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Aspirina
ERS:	Sociedad Respiratoria Europea
Fas1:	dominio extracelular FASCICLIN
FcεRI:	receptor de alta afinidad para la IgE
FeNO:	fracción exhalada del óxido nítrico

Fenotipos y endotipos de asma grave: mecanismos moleculares implicados en la patogénesis y en la desensibilización a aspirina

FEV1:	volumen espiratorio forzado en el primer segundo
FVC:	capacidad vital forzada
GEMA:	Guía Española para el manejo del asma
GINA:	Guía estratégica global para el manejo del asma
GM-CSF:	factor estimulante de colonias de macrófagos y mastocitos
IC:	intervalo de confianza
IgE:	inmunoglobulina E
IL-13:	interleucina 13
IL-17:	interleucina 17
IL-1b:	interleucina 1beta
IL-25:	interleucina 25
IL-3:	interleucina 3
IL-33:	interleucina 33
IL-4:	interleucina 4
IL-5:	interleucina 5
ILC2:	linfocitos innatos de tipo 2
IMC:	índice de masa corporal
kDa:	kilodalton, unidad de masa atómica
LTC4:	leucotrieno C4
LTD4:	leucotrieno D4
LTE4:	leucotrieno E4
mL/seg:	mililitro por segundo, unidad flujo volumétrico

Fenotipos y endotipos de asma grave: mecanismos moleculares implicados en la patogénesis y en la desensibilización a aspirina

MMP:	metaloproteinasas
NF-κB:	factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
pg/mL:	picogramos por mililitro
NK:	células “natural killer”
NO:	óxido nítrico
NOS:	óxido nítrico sintetasa
OSF-2:	factor específico de osteoblastos
<i>p</i>:	significación estadística
PBS:	buffer de fosfato salino
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
pH:	unidad de medida del nivel de acidez o alcalinidad
POSTN:	gen que codifica para la periostina
ppb:	partes por billón
<i>r</i>:	coeficiente de correlación de <i>Pearson</i>
rpm:	revoluciones por minuto
SARP:	Programa Americano de Investigación para el Asma Grave (Severe Asthma Research Programme)
SerpinB2:	proteína adaptativa, perteneciente a la familia de las serpinas
T2:	respuesta inflamatoria dirigida por linfocitos ILC2 y Th2
TCD4:	linfocitos T CD4
TGF-β:	factor de crecimiento transformante beta
Th1:	linfocitos T colaboradores (helper) de tipo 1

Fenotipos y endotipos de asma grave: mecanismos moleculares implicados en la patogénesis y en la desensibilización a aspirina

Th2:	linfocitos T colaboradores (helper) de tipo 2
TLRs:	receptores “toll like”
TSLP:	linfopoyetina estromal tímica
UI/L:	unidades internacionales por litro
μl:	microlitro
μm:	micrómetro

1. INTRODUCCIÓN

Esquema-resumen del capítulo 1

1.1. Definiciones actuales

Prevalencia e Impacto socio-económico del Asma y del Asma Grave

1.2. Fisiopatología del asma

Generalidades

Fenotipos y Endotipos

-Fenotipos inflamatorios clásicos: eosinofílico, neutrofílico, paucigranulocítico, mixto granulocítico

-Fenotipos moleculares: Th2 alto y Th2 bajo; Nomenclatura actual

-Transición fenotipos-endotipos

-Endotipos

-Endotipo EREA: enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina

1.3. Utilidad de los Biomarcadores no invasivos en el asma

Generalidades

Espujo inducido

Periostina y TSLP

1.4. Abordaje actual del asma grave

-Abordaje sin hipótesis previa hacia la medicina de precisión: diagnóstico y tratamiento por feno-endotipos

-Manejo integral diagnóstico-terapéutico de los pacientes con asma grave en la Unidad Interdisciplinar de Asma del Hospital Universitario La Paz

-Manejo interdisciplinar de la EREA y la Desensibilización a aspirina

1.5 Hipótesis y justificación del presente trabajo

1.1. Definiciones actuales

La definición del **asma** aceptada actualmente es la siguiente: “*El asma es una enfermedad **heterogénea**, caracterizada habitualmente por una inflamación crónica de la vía aérea. Se define por la presencia de síntomas respiratorios tales como sibilancias, falta de aire, opresión torácica y tos, que pueden variar en el tiempo y en intensidad, junto a una limitación variable al flujo aéreo.*”

Esta definición ha sido acordada por consenso (1), basándose en las características típicas del asma que la distinguen de otras condiciones respiratorias. De forma simplificada, el asma se caracteriza por **3 alteraciones fisiopatológicas fundamentales e interdependientes**: la inflamación, la hiperreactividad bronquial y los cambios estructurales de la vía aérea, denominado "remodelación". Conseguir el control del asma depende en gran parte de tratar y/o prevenir estas alteraciones.

El consenso ERS/ATS (*European Respiratory Society/ American Thoracic Society*) del año 2014 define el **asma grave en adultos** como aquella que precisa para su control una alta dosis de corticoides inhalados además de un LABA (antagonista de receptores beta-2 de larga duración), antagonista de leucotrienos o teofilina; o que necesita corticoides sistémicos durante más de la mitad del año precedente; o bien que a pesar de estos tratamientos permanece “no controlada” (2).

El **asma no controlada** se define como la ausencia de control sintomático (ACT [Asthma Control Test] < 20 puntos, o ACQ [Asthma Control Questionnaire] > 1,5 puntos), dos o más exacerbaciones graves en el año previo o una exacerbación que haya precisado ingreso hospitalario, o evidencia de obstrucción bronquial permanente (FEV1 < 80%). Por lo tanto, según esta definición, un paciente con asma grave puede estar o no

estar bien controlado. El concepto de asma grave debe ser, por lo tanto, puesto en el contexto de otro más amplio: “**asma difícil de tratar**”, o “**asma de control difícil (ACD)**” (1-4).

La definición actual de **asma de control difícil** según las guías nacionales-GEMA 4.1 (Guía Española para el Manejo del Asma 2016) (3) y normativa SEPAR 2015 (4), se basa en la definición ATS/ERS 2014. Según consensos y guías de práctica clínica previos (consenso ATS 2000, GEMA 2009) se recomendaba identificar y tratar las **comorbilidades** en todos los casos de “asma difícil de tratar”, y sólo después de ello podíamos hablar de “asma grave”. Pero en muchas ocasiones es imposible curar, eliminar totalmente las comorbilidades, por muy bien que se manejen (por ejemplo, en casos de rinosinusitis crónica con poliposis recidivante, intolerancia a AINE, obesidad, depresión u otros trastornos psiquiátricos). Es decir, sufrir una poliposis nasal sintomática no debe excluir la posibilidad de padecer un asma grave (de hecho, esto es así en muchas ocasiones). El consenso ATS/ERS 2014 aclara que **asma grave** es una definición que incluye a pacientes “con asma refractaria, y aquéllos en los que el tratamiento de las comorbilidades permanece incompleto” (2).

Prevalencia e Impacto socio-económico del Asma y del Asma Grave

El asma es una enfermedad de alta prevalencia en nuestra sociedad. En España se estima que entre el 3 al 10% de la población tiene asma, afectando al 5% de la población adulta y hasta al 10% de la población infantil (5-6).

El coste global del asma excede el coste combinado del VIH/SIDA y la tuberculosis llevándose el 2% de los recursos de la Sanidad pública. Es destacable que la carga económica es mayor en pacientes con asma grave no controlada, que suponen

un 5-10% de todos los pacientes pero consumen el 50% de los recursos sanitarios dedicados al asma (4).

La prevalencia de asma grave no controlada en España se estima en torno a los 80.000 pacientes, sin embargo los costes directos e indirectos del asma no controlada pueden ser hasta diez veces superiores a los del asma bien controlada. A pesar de la existencia de fármacos ampliamente disponibles y efectivos, así como de directrices uniformes de manejo, lograr y mantener el control del asma sigue siendo un desafío permanente. Estudios recientes realizados en países europeos (Francia y España) muestran que más del 50% de los pacientes con asma no están controlados. Estos datos indican claramente que son necesarios tratamientos alternativos, especialmente para pacientes con asma grave no controlada (7, 8).

El reto en el tratamiento del asma reside precisamente en su heterogeneidad. Mejorar nuestra comprensión de los mecanismos que subyacen la respuesta a uno u otro tratamiento en los pacientes con asma todavía representa una tarea pendiente. En la última década se han realizado notables esfuerzos para identificar las características del asma grave, que son diferentes a las descritas para el asma leve a moderada, preparando el escenario para el desarrollo de nuevos fármacos. Las opciones más prometedoras están representadas por las terapias biológicas, en particular los anticuerpos monoclonales frente a dianas selectivas, algunos ya disponibles, o bien en ensayos clínicos fase III o aprobados, pendientes de próxima comercialización (9). Por ello, las guías actuales recomiendan determinar el perfil individual de alteraciones fisiopatológicas predominantes en cada paciente para prescribir el tratamiento más adecuado en cada caso (1, 2, 3, 4). El enfoque actual y futuro para el manejo del asma debe incluirla estratificación de los pacientes según los fenotipos (clínicos,

inflamatorios, funcionales, moleculares) y endotipos descritos (asma alérgica en adultos, asma con hipersensibilidad a aspirina, asma hipereosinofílica de inicio tardío, asma no eosinofílica), con el fin de ayudar a personalizar, a individualizar, la respuesta a los diferentes tratamientos para el asma.

Los pacientes con **asma grave y/ o de control difícil (ACD)** deberían ser controlados en **unidades especializadas** y por personal sanitario con experiencia. El abordaje diagnóstico y terapéutico del ACD se debe de hacer siguiendo un esquema protocolizado mediante algoritmos de decisión, que de forma secuencial establezcan las maniobras y fármacos que se han de emplear de forma racional, de menor a mayor agresividad, y teniendo en cuenta su elevado coste (3, 4).

1.2.Fisiopatología del asma

Generalidades

Como se ha mencionado, el asma se caracteriza por **3 alteraciones fisiopatológicas fundamentales e interdependientes**: la inflamación, la hiperreactividad bronquial y los cambios estructurales de la vía aérea, **proceso** denominado "remodelación".

1. El componente **inflamatorio** implica principalmente a eosinófilos, mastocitos y células T CD4+. Estas células activadas generan y liberan cantidades importantes de especies reactivas de oxígeno (anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxil) y de nitrógeno (NOx), producen citocinas proinflamatorias (las denominadas **Th2- IL-4, IL-5, IL-13** entre otras), lípidos, como los derivados de leucotrienos cisteinílicos (**LTC4, D4**), **prostaglandinas (PGD2, E2)**, PAF, entre otras. Además, los eosinófilos segregan una serie de enzimas degradadoras, como la elastasa, la

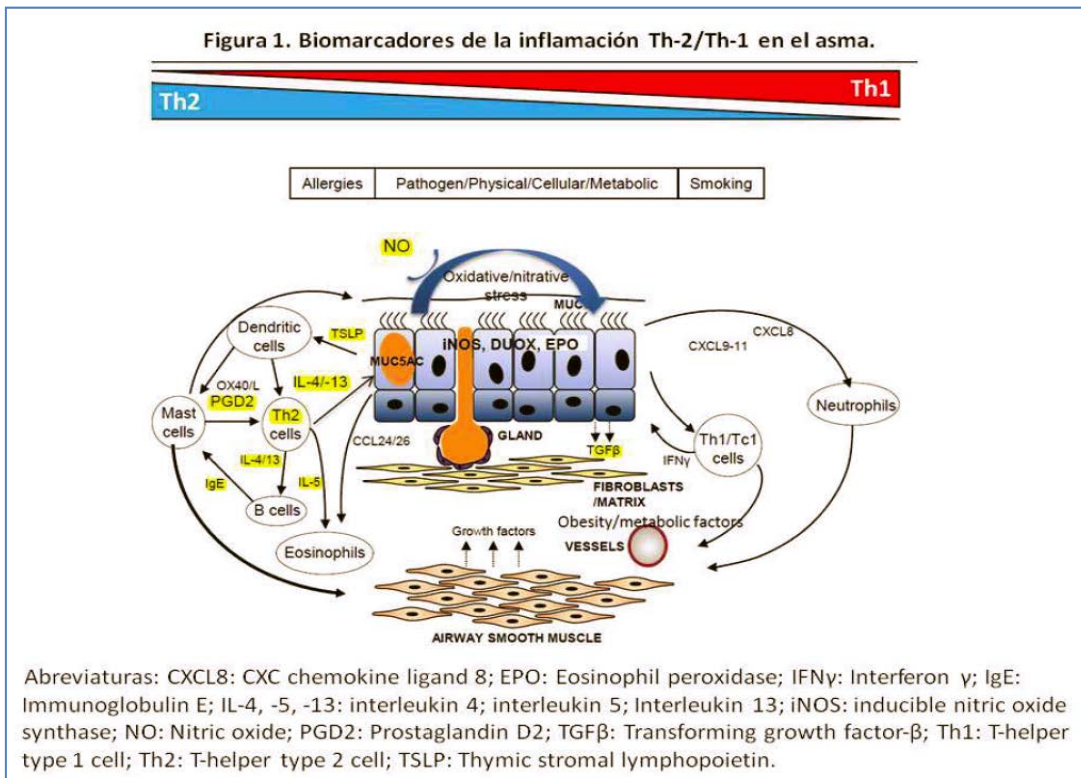
colagenasa, las ribonucleasas, y liberan las proteínas catiónicas de sus gránulos (MBP, ECP), altamente tóxicas para el epitelio pulmonar, que además incrementan la permeabilidad vascular y provocan la contracción de la musculatura lisa de las vías aéreas, la denominada hiperreactividad bronquial, en la cual la degranulación mastocitaria (PGD2, LTC4) juega además un papel crucial (10-12).

2. La **hiperreactividad bronquial** es común en todos los asmáticos, pero resulta particularmente peligrosa en aquellos subgrupos de asmáticos incapaces de producir en cantidad suficiente mediadores lipídicos broncoprotectores (lipoxina A4-LXA4, o PGE2). El mejor ejemplo es la triada-ASA o asma con intolerancia a aspirina/AINE, que se caracteriza por un lado por la producción excesiva, genéticamente determinada, de potentes broncoconstrictores- leucotrienos cisteinílicos (LTC4, D4) y de prostaglandina PGD2, y por otro lado de una producción insuficiente de LXA4 y PGE2 (12-15).

3. La **remodelación** es consecuencia de un excesivo y defectuosos proceso de reparación y regeneración tras repetidos ataques, que incluye un incremento en los depósitos de proteínas de la matriz extracelular (procolágeno III y proteoglicanos) en la membrana basal reticular y en la submucosa bronquial. Otras características de este proceso incluyen una hipertrofia de la musculatura lisa, hiperplasia de las células caliciformes y la fibrosis subepitelial (16-20). Muchas citocinas y factores de crecimiento que intervienen en el proceso de remodelación han sido identificadas, pero el papel central parece que lo tiene la **IL-13**, por lo cual en los últimos años se han identificado una serie de potenciales biomarcadores relacionados con su actividad, los denominados "**biomarcadores Th2**", ya que medir la IL-13 como tal es una técnica compleja, cara y al alcance de pocos centros de alto nivel experimental. Estos

Fenotipos y endotipos de asma grave: mecanismos moleculares implicados en la patogénesis y en la desensibilización a aspirina

biomarcadores **Th2** son: eosinofilia en sangre periférica y en esputo inducido, IgE total, fracción de óxido nítrico en aire exhalado (FENO), y periostina (21-26) (ver Figura 1).



Modificada de (2): Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. Eur Respir J 2014.

Dos anticuerpos monoclonales desarrollados para el tratamiento del asma están ya comercializados (omalizumab y mepolizumab) (27-29), y otros varios están actualmente en ensayos clínicos de fase III. De ellos, los que tienen el mayor potencial para llegar a su uso en la clínica en los próximos años son: tralokinumab (anti-IL 13), reslizumab y benralizumab (todos anti-IL-5), dupilumab (anti IL-4/13) (30-33). Con la aparición de estos agentes biológicos, ha resurgido un interés en la identificación de fenotipos y endotipos clínicamente significativos con la ayuda de **biomarcadores no invasivos** (27). Determinar por lo tanto el perfil inflamatorio y el fenotipo/ endotipo de asma en cada paciente tiene como fin personalizar, individualizar, la respuesta a los diferentes tratamientos, ya existentes o próximamente disponibles para el asma (34).

Fenotipos y Endotipos

Entendemos por **fenotipo** las características observables de un individuo, siendo éstas el resultado de la interacción de los genes (genotipo) y del medio ambiente. El endotipo es un concepto más ambicioso, que va más allá del fenotipo, y hace referencia al proceso biológico que explica las propiedades observables de un fenotipo. El endotipo implica la identificación clara del mecanismo subyacente, lo que permite identificar dianas terapéuticas concretas (35).

En relación a los fenotipos, se han propuesto inicialmente las clasificaciones denominadas “sesgadas”, así calificadas porque tienen en cuenta una única variable o bien como mucho un pequeño número de variables asociadas a la enfermedad. Dentro de estas aproximaciones estaría la clasificación de los fenotipos en función de: el origen del asma- extrínseca (alérgica)/intrínseca (no alérgica); la edad de inicio: asma de inicio precoz/asma de inicio tardío; los desencadenantes: asma relacionada con el ejercicio, con el tabaquismo u otros irritantes, aspirina, entre otros; y, finalmente, según el patrón inflamatorio: los fenotipos clásicos- eosinofílico, neutrofílico, mixto granulocítico, paucigranulocítico (36-39), o los más recientemente descritos fenotipos moleculares Th2 alto y Th2 bajo (40, 41).

Fenotipos inflamatorios clásicos

El tipo de inflamación ha servido para dividir a los asmáticos en diferentes grupos. Las técnicas más empleadas para el estudio de los fenotipos inflamatorios han sido el análisis del esputo inducido, el lavado broncoalveolar (LBA) y las biopsias bronquiales(23, 36). En la actualidad, el análisis de la fracción exhalada de óxido nítrico

(FeNO) ocupa un papel relevante para la identificación de la inflamación eosinofílica, dado su facilidad de uso y reproducibilidad de las mediciones, si bien su utilidad no está exenta de controversias (42).

En base a los distintos estudios realizados en esputo inducido, los sujetos con >2 -3% de eosinófilos fueron clasificados como asma eosinofílica, aquellos con $> 61\%$ de neutrófilos y <2 -3% de eosinófilos como neutrofílica, los que tenían $> 61\%$ de neutrófilos y >2 -3% de eosinófilos como asma granulocítica mixta, y aquellos con $< 61\%$ de neutrófilos y <2 -3% de eosinófilos se clasificaron como asma paucigranulocítica. Los puntos de corte para la eosinofilia varían en las distintas publicaciones entre 2-3%, mientras que para la neutrofilia se aceptan valores entre 61-65% (36).

En el caso de los pacientes con asma grave, el Programa de Investigación en Asma Grave (SARP: Severe Asthma Research Programme) fue puesto en marcha en los EEUU con la intención de identificar y caracterizar un gran número de pacientes que cumplan criterios de gravedad. Este grupo de investigadores ya había destacado, en publicaciones previas, que los pacientes con asma grave tienen peor función pulmonar, más síntomas, menos atopia, más posibilidades de ser hospitalizados y reciben más medicación que los pacientes con formas más leves de la enfermedad (43). En cuanto a los fenotipos inflamatorios, un subanálisis del estudio SARP centrado en 175 pacientes con características de asma grave (44) buscó diferencias clínicas y fisiopatológicas entre los pacientes según la celularidad del esputo como marcador de la inflamación subyacente. La presencia en el esputo de $>2\%$ de eosinófilos como la de $>40\%$ de neutrófilos se relacionan con una peor función pulmonar, mayor morbilidad y más agudizaciones. El “fenotipo eosinofílico”, a diferencia del “fenotipo neutrofílico” presentó valores más elevados de FeNO, más eosinofilia periférica y mayor necesidad

de medicación de rescate. Los pacientes que reunían ambas características, fueron los más graves (44).

-Fenotipo eosinofílico

El fenotipo eosinofílico es el más frecuente, detectándose en más del 50% de los asmáticos con independencia de la gravedad de la enfermedad. Se puede encontrar indistintamente tanto en asma leve, moderada o grave. En el asma grave este tipo de inflamación se suele asociar con el comienzo tardío de la enfermedad, poliposis y sensibilidad al ácido acetilsalicílico. En los casos leves o moderados se asocia con atopia y sensibilización a alérgenos.

Los pacientes con inflamación eosinofílica mantenida pese a un tratamiento adecuado son más sintomáticos, tienen un peor control de la enfermedad y un mayor riesgo de exacerbaciones (23, 36).

La cuantificación de los eosinófilos en el esputo inducido es un método eficaz en el seguimiento y control evolutivo del asma bronquial, siendo un buen marcador de respuesta a los esteroides. Una reducción en el número de eosinófilos en el esputo del 2 al 3% se asocia con una disminución significativa en el número de exacerbaciones y hospitalizaciones por asma bronquial.

-Fenotipo neutrofílico

Poco sabemos de este fenotipo, dado que carecemos de estudios longitudinales, por lo que no queda claro si el asma neutrofílica se desarrolló sobre un fondo de asma eosinofílica de larga evolución, o de infecciones bacterianas recurrentes o persistentes superpuestas en el fondo de un asma previamente eosinofílica, o bien si se trata de otra patología diferente.

En niños predomina el asma eosinofílica, tanto en la forma aguda como en la enfermedad estable, siendo la inflamación neutrofílica más frecuente en los niños con asma no atópica. Este fenotipo se presenta con mayor frecuencia en asma de aparición tardía (adultos), ausencia de atopia, consumo de tabaco, obesidad, en algunos casos de asma ocupacional y en atletas de élite. Es más frecuente en pacientes con asma grave, aunque suelen tener menos exacerbaciones si lo comparamos con el fenotipo eosinofílico, y la respuesta a los corticosteroides es pobre (37, 39, 45).

Dentro de los mecanismos implicados en la patogénesis del asma no eosinofílica se ha propuesto: a) la activación de las respuestas inmunitarias innatas con un posible papel de las bacterias, virus y dieta; b) la activación de la elastasa de neutrófilos; c) la alteración del reclutamiento nuclear de la histona desacetilasa (HDAC) 2; d) aumento en los factores de promoción de neutrófilos; y e) el papel de los linfocitos Th17 (46, 47).

Como hallazgos destacados en el asma neutrofílica figuran una limitación crónica del flujo aéreo, una disminución de la hiperreactividad bronquial y bajos niveles de la FeNO. No se ve el engrosamiento de la membrana basal subepitelial y el perfil inflamatorio no es Th2, como se veía en la inflamación eosinofílica del adulto. Dentro de los biomarcadores propuestos para este grupo se encuentran la IL-8, la IL-17 y el LTB4 (46, 47).

-Fenotipo paucigranulocítico

Es un fenotipo infrecuente y se corresponde con pacientes asmáticos bien controlados o con asma intermitente. Presentan escasa sintomatología, a pesar de recibir en ocasiones un tratamiento con esteroides a dosis elevadas. En estos casos se ha propuesto que su patogenia e inflamación pudiera estar desencadenada por otro tipo de

células, como los mastocitos, células epiteliales o células del músculo liso. En este fenotipo no se han identificado marcadores biológicos.

-Fenotipo granulocítico mixto

Este tipo de inflamación es la que con menos frecuencia se ve en los pacientes con asma (39).

Fenotipos inflamatorios moleculares: Th2 alto y Th2 bajo.

Woodruff et al (40) realizaron en 2009 un estudio en pacientes con diagnóstico de asma moderada y grave comparado con sujetos normales. Se determinaron mediante microarray y PCR, en cultivos de células epiteliales obtenidas por cepillado bronquial, tres genes: periostina (POSTN), CLCA1 (proteína inductora de los canales de cloro y calcio) y SerpinB2 (proteína adaptativa para la regulación de la respuesta inmunológica Th1). Con este sistema se podía diferenciar a los asmáticos entre Th2 altos y Th2 bajos. Se encontró que aproximadamente el 50% de los pacientes tenían una expresión TH2 bajo, similar a la de personas sanas. Los asmáticos Th2 alto tenían mayores cantidades de IL-13, IL-5 y más eosinófilos, mastocitos y más atopia y remodelado. Aparte, y de forma interesante, respondían a los corticoides inhalados, mientras que los Th2 bajos no lo hacían. Este estudio valida, según el análisis de expresión de genes en biopsias bronquiales, un esquema de clasificación que podemos medir todos, donde estos perfiles Th2 altos y bajos se traducen en la periferia. Se ha propuesto un punto de corte para clasificar a los pacientes asmáticos en Th2-alto o Th2-bajo mediante la utilización de dos variables (la IgE total en sangre periférica y la eosinofilia, debiéndose cumplir que el paciente presente valores de IgE total > ó igual a 100 UI/mL y de eosinofilia > ó igual

a 140 por milímetro cúbico, ambas inclusive, para identificarlo dentro del grupo Th2 alto (40, 41).

-Fenotipo Th₂ alto

El asma se ha considerado tradicionalmente como un proceso Th₂, relacionándose fuertemente con la atopia, alergia, reacciones de hipersensibilidad, inflamación eosinofílica y respuesta a los corticosteroides. Un gran porcentaje de los pacientes con asma muestra este patrón fisiopatológico y, en consecuencia, este comportamiento clínico, aunque no es el caso de todos los asmáticos. Este tipo de pacientes con predominio de respuesta de Th₂ (Th₂ altos) puede verse tanto en los pacientes asmáticos de comienzo precoz como tardío (48, 49).

-Fenotipo Th₂ alto de aparición temprana

Los pacientes con asma Th₂ alto de aparición precoz suelen asociar atopia, rinitis alérgica y dermatitis atópica. Los niveles de IgE total o específica suelen estar más elevados que en el asma de aparición tardía. Los niveles de citoquinas Th₂ están más elevados en los pacientes con asma atópica que en los pacientes con atopia pero sin asma. Puede verse tanto en pacientes con asma leve-moderada como en asmáticos graves. Los pacientes más graves suelen presentar un mayor número de reacciones cutáneas y una peor función pulmonar.

-Fenotipo Th₂ alto de aparición tardía

Se trata de pacientes con debut del asma en la edad adulta y un predominio de inflamación Th₂. La persistencia en el esputo inducido de eosinofilia (≥ 2 % del recuento total de células) a pesar del tratamiento con corticosteroides se asocia con esta forma de asma, de aparición tardía y menos alérgica. Este tipo de asma suele asociarse a sinusitis, pólipos nasales e intolerancia al AAS (u otros AINE). La mayoría de estos

pacientes (75%) también asocian pruebas cutáneas positivas frente a diferentes aeroalérgenos. Suelen ser pacientes con asma grave desde el inicio de la enfermedad y responden peor a los CI/CO que los pacientes con predominio de inflamación Th₂ de aparición precoz. Es en estos pacientes donde las nuevas terapias dirigidas pueden ocupar un papel relevante.

-Fenotipo Th2 bajo

Este grupo representa también a un grupo importante de asmáticos, pudiendo caracterizar hasta a la mitad de los pacientes diagnosticados de asma. Sin embargo, al contrario que pasaba con el fenotipo Th₂ alto, se sabe menos de su fisiopatología. Los pacientes suelen debutar en la edad adulta, sin antecedentes de atopia o alergia, con un menor grado de obstrucción e hiperreactividad y una peor respuesta a los CI/CO que los asmáticos con predominio Th₂ (47, 48, 49).

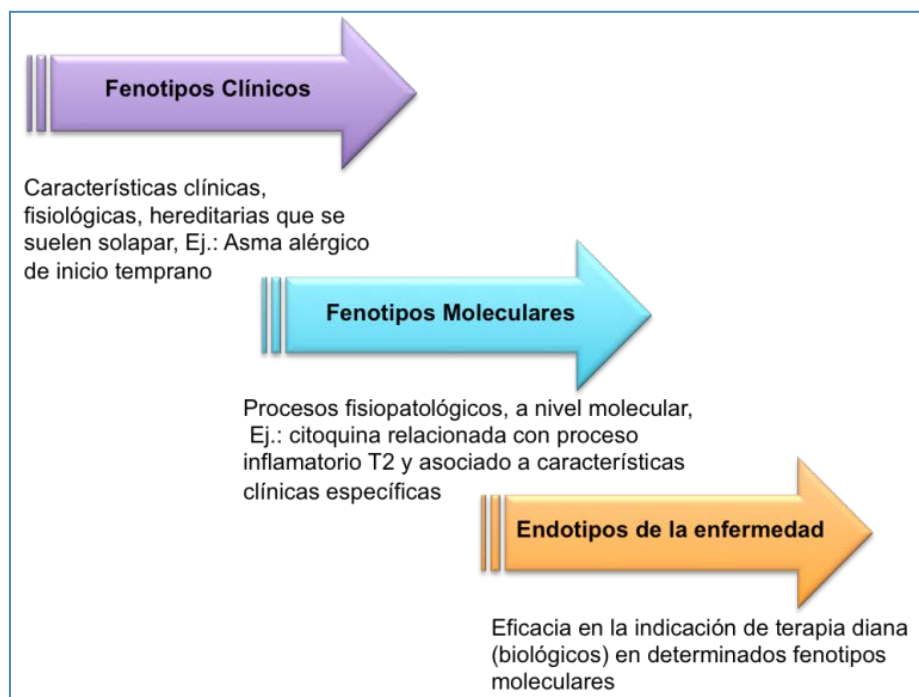
Nomenclatura actual: T2 en lugar del clásico Th2.

Recientemente, gracias a los avances en los conocimientos sobre la patogénesis del asma, se propone que el término T2 en lugar de Th2 sería más adecuado, ya que IL-5 e IL-13 son producidos no únicamente por los linfocitos T CD4⁺ sino también por los mastocitos, eosinófilos, basófilos y los linfocitos innatos tipo 2, los denominados ILC2 (group 2 innate lymphoid cells). Los ILC2, además de productoras de las principales citocinas efectoras IL-5 e IL-13 del asma vía Th2, se ha demostrado que pueden llegar a promover la persistencia de la eosinofilia en la vía aérea pese a las altas dosis de corticoides orales (Smith SG, JACI 2016). Por lo tanto, de ahora en adelante los fenotipos moleculares se denominarán, a lo largo de esta tesis, **T2 alto** y **T2 bajo** (50-53).

Transición fenotipos-endotipos:

A pesar de que los fenotipos son clínicamente relevantes, en términos de presentación, desencadenantes y respuesta terapéutica, no arrojan necesariamente luz sobre los procesos fisiopatológicos subyacentes. El término “endotipo”, propuesto por Anderson, hace referencia a subtipos de una enfermedad definidos por procesos fisiopatológicos concretos. En consecuencia, describen distintas entidades patológicas de acuerdo con una etiología bien definida y/o un mecanismo fisiopatológico consistente. De esta forma, un endotipo puede contener varios fenotipos y, al revés, ciertos fenotipos pueden aparecer en más de un endotipo. Por ello, Wenzel propone una nueva aproximación a los fenotipos asmáticos: evolución desde la aproximación clínica a los mecanismos moleculares, para llegar finalmente al endotipo (38, 54) (ver Figura 2).

Figura 2. Transición de las definiciones desde fenotipos clínicos hacia fenotipos moleculares y endotipos de asma.



Modificada de (54): Ray A, Oriss T, Wenzel S. Emerging molecular phenotypes of asthma. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2015; 308:L130-L140.

Endotipos

En el año 2011, un consenso de expertos (35) planteó una nueva aproximación en la clasificación del asma que permitiera abordar de una forma más racional los aspectos diagnósticos y terapéuticos en los pacientes asmáticos. Este consenso introduce

el término denominado “endotipo”, que puede ser definido como: un subtipo de enfermedad asmática que es determinada por un mecanismo funcional o fisiopatológico único y diferenciado.

La definición de un endotipo verdadero requiere una historia natural unívoca, características clínicas y fisiopatológicas comunes, con una fisiopatología subyacente identificable con diferentes biomarcadores y características genéticas y una respuesta predecible a tratamientos generales y específicos. O sea que cuando estén bien definidos desaparecen como endotipos y se convierten en lo que llamamos “enfermedad”. De esta forma se proponen los siguientes endotipos (35):

-Asma alérgica

De forma característica, tiene su inicio en la infancia y se asocia a manifestaciones atópicas (sensibilización a alérgenos y rinitis alérgica). La eosinofilia bronquial es un hecho común y el proceso fisiopatológico subyacente es de tipo Th2. La inhalación de desencadenantes alérgicos específicos puede producir broncoconstricción aguda habitualmente seguida por una respuesta tardía. Este endotipo incluye un amplio rango de severidad y de respuestas al tratamiento.

-Aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA)

Se caracteriza por un patrón inflamatorio mixto eosinofílico y neutrofílico, elevación de IgG e IgE específicas para *Aspergillus*, episodios de broncoespasmo, desarrollo de LCFA, impactación mucoide y formación de bronquiectasias.

-Asma hipereosinofílica de inicio tardío (AHEIT)

Define a un cierto subgrupo de asmáticos que pueden desarrollar agudizaciones graves, que pueden ser prevenidas por el empleo de corticoides sistémicos, pero no

inhalados. Es habitual la hipereosinofilia sanguínea ($> 1000/\text{mm}^3$) y en esputo ($> 10\%$). Supone aproximadamente el 20% de los pacientes con asma refractaria, y la prevalencia de sensibilización alérgica es menor que en el fenotipo de “asma alérgica”. La respuesta broncodilatadora y la HRB pueden ser menores que en el caso del endotipo alérgico. En este endotipo se clasifican los pacientes con asma eosinofílica de inicio tardío que toleran aspirina y el resto de AINE, ya que el asma con intolerancia a aspirina/AINE constituye un endotipo aparte, que se detalla a continuación.

-Endotipo EREA: enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina

Uno de los primeros endotipos de asma que se han establecido es la enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina (EREA), entidad conocida clásicamente como ASA-triada o triada de Widal o de Samter, asma inducida por aspirina o intolerancia a aspirina, descrita por primera vez en 1918 por Fernand Widal y consagrada en 1967 por Samter y Beers. En la Tabla 1 hemos resumido un glosario de sinónimos de la enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina (EREA) empleados en la literatura médica a lo largo del tiempo (55, 56).

En realidad se trata de una hipersensibilidad no alérgica a todos los AINE que inhiben la COX-1, caracterizada por la existencia de varias enfermedades concomitantes de expresión clínica variable: la rinosinusitis, el asma bronquial y la poliposis nasosinusal, que se exacerban (habitualmente con una reacción nasocular y/o una crisis asmática) tras la exposición diagnóstica o terapéutica a un AINE.

Tabla 1. Glosario de sinónimos de enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina (EREA) empleados en la literatura médica.

Español	English
Nomenclatura actual:	
EREA: enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina	<i>AERD: Aspirin-exacerbated respiratory disease</i>
Intolerancia a AINE/aspirina	<i>NSAIDs/aspirin intolerance</i>
Idiosincrasia a AINE/aspirina	<i>NSAIDs/Aspirin idiosyncrasy</i>
Asma con intolerancia a aspirina	<i>Aspirin-intolerant asthma</i>
Asma inducido por aspirina	<i>Aspirin-induced asthma</i>
Sensibilidad/ hipersensibilidad a aspirina	<i>Aspirin sensitivity/hypersensitivity</i>
Síndrome ASA triada / triada de Widal o de Samter	<i>The aspirin triad/ Widal's or Samter's triad.</i>

AERD, Aspirin-exacerbated respiratory disease

AINE, fármaco antiinflamatorio no esteroideo

ASA, acetyl-salicylic acid

EREA, enfermedad respiratoria exacerbada por AINE

NSAIDs, non-steroid anti-inflammatory drugs

Tomado de (56): I Bobolea, J Quiralte. Enfermedad respiratoria exacerbada por antiinflamatorios no esteroideos. En: Asma Grave. P Barranco, S Quirce Eds. Luzan 5 S.A. 2013: ISBN 978-84-7989-759-8: 131-50.

La **prevalencia de la EREA** (diagnóstico realizado mediante provocaciones) alcanza el 30% y el 40% cuando al asma se asocian rinosinusitis crónica y poliposis

nasal, respectivamente. En uno de los pocos estudios españoles publicados, la prevalencia de la EREA fue de 15% entre los adultos con asma intrínseca (57, 58).

Clínica: los síntomas suelen iniciarse entre la adolescencia y los 40 años. En un estudio europeo que incluyó 500 pacientes, la edad media fue de 29 años. Parece que las mujeres adquieren la enfermedad con más facilidad que los varones y la progresión de la enfermedad es más rápida y severa en ellas. Por otra parte, no se ha encontrado ninguna asociación racial o étnica. El primer síntoma de la EREA suele ser la congestión nasal, confundido en pacientes riníticos con alguna reagudización ó con una infección de vías altas. Muchos pacientes rememoran este episodio como un “resfriado que nunca se curó del todo”. Después de este episodio, se desarrolla la siguiente secuencia clínica: primero, una rinitis/ rinosinusitis crónica (RSC), seguido de una sinusitis eosinofílica hiperplásica crónica (SEHC), hiposmia, poliposis nasal y, finalmente, asma. La hiposmia y la anosmia ocurren en la mayoría de los pacientes con EREA. La ausencia de alteraciones en el olfato llega a descartar el diagnóstico en más del 85% de los casos. En estos casos la RSC y la PN representan estadios diferentes de la misma enfermedad. La poliposis en los pacientes con EREA, bilateral y eosinofílica, es grave y difusa, más agresiva, recidivante y resistente al tratamiento que la poliposis común, en casos extremos invadiendo y deformando las cavidades nasales y sinusales, sobresaliendo por los vestíbulos nasales y proyectándose hacia la nasofaringe. A veces, incluso provoca deformaciones óseas faciales, menos frecuentes en la actualidad debido a las intervenciones quirúrgicas precoces. La sinusitis bacteriana es una complicación habitual en estos pacientes (59-62).

El asma puede estar presente en la infancia, desarrollarse en la adolescencia ó, lo más común, iniciarse *de novo* entre 3 meses y hasta 5 años después de la aparición

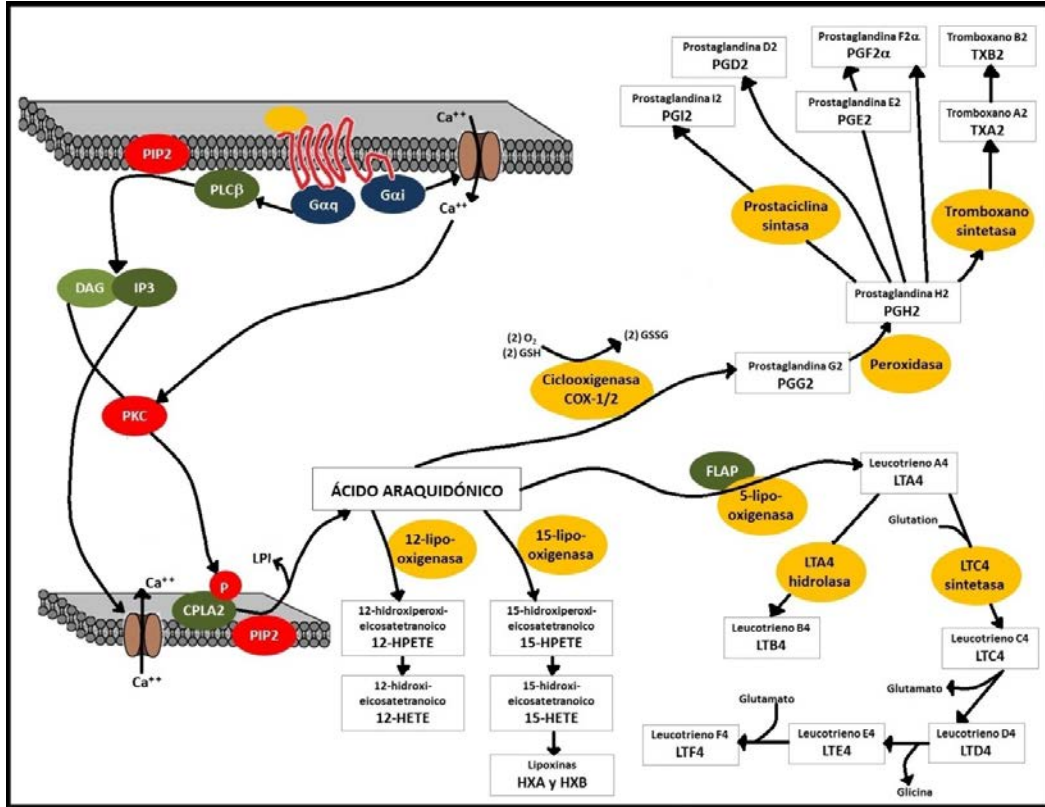
de la congestión nasal y de los pólipos, siendo un asma de intensidad moderada o grave y de difícil control.

Las reacciones respiratorias por AINE pueden aparecer en cualquier momento del curso de la enfermedad, o bien ser el inicio de ella. Consisten en aparición de rinorrea intensa/ hidrorrea, congestión nasal, inyección conjuntival, edema periorbitario, laringospasmo y broncoespasmo severo. La mayoría de los pacientes sufren síntomas tanto de vías altas como de vías bajas, asociando, en alguna ocasión, síntomas extrapulmonares (gastrointestinales, cutáneas ó vasculares).

La evitación de AINE no asegura que la inflamación de las mucosas respiratorias desaparezca. Habitualmente, el asma y la poliposis siguen su curso, progresando y persistiendo para toda la vida (56, 57, 59-62).

La etiopatogénesis de la EREA no está aún aclarada completamente. El patrón inflamatorio eosinofílico y las alteraciones en la ruta metabólica de degradación del ácido araquidónico son los elementos clave que nos ayudan a explicar la expresión clínica de la EREA. Por ejemplo, la producción de citoquinas IL3, IL4, IL5, IL13 y GM-CSF, que determinan una respuesta Th2 preferente, tienen un papel fundamental en el reclutamiento tisular de los eosinófilos e incrementan *in vitro* la vida media de estas células inhibiendo la apoptosis. Por otra parte, los LTC₄, LTD₄ y LTE₄ o cisteinil-leucotrienos (Cis-LT) son potentes quimiotácticos para los eosinófilos. La susceptibilidad para el desarrollo de EREA parece radicar en alteraciones uni o polifocales en las rutas de degradación del ácido araquidónico. Los metabolitos de estas rutas metabólicas involucrados en la patogénesis de la EREA son los leucotrienos (LT) y las prostaglandinas (PG). Ver Figura 3 (62-67).

Figura 3: Representación esquemática de las principales rutas de metabolización del ácido araquidónico.



PLA₂, Fosfolipasa A2

5-LO, 5 lipooxigenasa; FLAP, proteína activadora de la 5-lipooxigenasa.

12-HETE, 12-hidroeicosatetranoico; 12-HPETE, 12-hidroxi-peroxieicosatetranoico;

15-HETE, 15-hidroeicosatetranoico; 15-HPETE, 15-hidroxi-peroxieicosatetranoico;

CPLA2: calcium-dependent phospholipase A2 (Fosfolipasa A2 dependiente de Ca⁺⁺)

COX-1/COX-2, ciclooxigenasa 1 y 2

DAG: diacilglicerol

GSH, glutathione (glutación "reducido"); GSSG, glutathione disulfide (glutathione disulfuro)

Gs y Gq, proteínas G estimuladoras; Gi, proteínas G inhibitorias.

IP3: inositol trifosfato

LT, leucotrieno; LTA4, leucotrieno A4; LTB5, leucotrieno B4; LTC4, leucotrieno C4;

LTD4, leucotrieno D4; LTE4, leucotrieno E4; LTF4, leucotrieno F4

PG, prostaglandina; PGD2, prostaglandina D2; PGE2, prostaglandina E2; PGF2α, prostaglandina F2α; PGG2, prostaglandina G2; PGH2, prostaglandina H2; PGI2, prostaglandina I2

PIP2: phosphatidylinositol biphosphate (fosfatidil-inositol bifosfato)

PKC: protein kinase C (proteín cinasa C)

PLCβ: phosphatidylinositol phospholipase C (fosfatidilinositol fosfolipasa C β)

TX, tromboxano; TXA2, tromboxano A2, TXB2, tromboxano B2.

En muchos casos, aunque no en todos, se detecta una sobreexpresión de la LTC₄ sintetasa en eosinófilos y células mastocitarias, que determinaría consecuentemente unos niveles elevados de LTE₄ urinario incluso antes de la exposición con el AINE (68-70). Por otro lado, la capacidad de biosíntesis de lipoxinas (productos de degradación del ácido araquidónico mediante interacciones transcelulares en el foco inflamatorio, con potentes propiedades antiinflamatorias) es limitada en los pacientes con EREA comparados con los asmáticos que toleran AINE, sin embargo los mecanismos responsables de este desequilibrio permanecen desconocidos.

Diagnóstico: La clave del diagnóstico es una historia clínica detallada. La EREA debe sospecharse ante cualquier asmático, sobre todo si presenta también rinosinusitis crónica/PN o incluso sólo alteraciones del olfato. De hecho, la guía POLINA (guía de consenso SEAIC-SEORL sobre manejo de la poliposis naso-sinusal) (71) recomienda investigar la presencia de intolerancia a los AINE en todos los pacientes diagnosticados de PN. Por ello, hay que insistir en la anamnesis de estos pacientes sobre el empeoramiento de síntomas respiratorios de vías altas y/o bajas tras la exposición a cualquier AINE, incluso por vía tópica.

En la actualidad, la inflamación presente en la vía aérea se puede valorar mediante la FeNO (fracción de óxido nítrico en aire exhalado) y el esputo inducido, pero ante la ausencia de pruebas *in vitro*, el diagnóstico definitivo de la EREA sólo puede realizarse usando técnicas de exposición controladas con un AINE, preferentemente la aspirina (72-73). Según sea la vía de administración de la aspirina, podemos encontrar 4 tipos de técnicas de provocación: la oral, bronquial (inhhalada), nasal e intravenosa, siendo la última de uso exclusivo en Japón. La **prueba de exposición oral controlada con aspirina (PO)** es el patrón-oro para el diagnóstico de

la EREA. Es la más empleada en todo el mundo y la única en EEUU, sin embargo las eventuales reacciones son potencialmente graves.

En cambio, las pruebas de provocación bronquial (PB) o nasal (PN), que se realizan con acetilsalicilato de lisina (L-ASA), una sal soluble del ácido acetilsalicílico, por vía inhalatoria, son más seguras y resultan especialmente útiles cuando la PO esté contraindicada debido a la gravedad del asma. Sin embargo, al ser sus valores predictivos negativos más bajos que la PO, es conveniente que un resultado negativo de la PN/PB se siga cuando sea posible de la realización de la PO para establecer el diagnóstico definitivo (72-73).

El tratamiento de la EREA comprende, por una parte, la evitación de AINE, asegurando alternativas terapéuticas eficaces, y, por otra parte, el tratamiento médico-quirúrgico de las enfermedades de base y de sus eventuales complicaciones, incluyendo la desensibilización en casos seleccionados.

1. Prevención de las exacerbaciones desencadenadas por AINE. Es importante para prevenir los ataques de asma inducida por AINE, potencialmente muy graves e incluso fatales, y para ello deben de seguirse los siguientes consejos: nunca deben de administrarse inhibidores potentes de la COX-1 a pacientes con una historia de EREA ni a los asmáticos con poliposis asociada que desconocen si toleran los AINE. El paracetamol es el AINE alternativo más usado como analgésico y antitérmico. Los inhibidores altamente selectivos de la COX-2 (coxibs), y en muchos casos los inhibidores parcialmente selectivos de la COX-2, como el meloxicam, son los fármacos antiinflamatorios de primera opción en estos pacientes, previa confirmación de su tolerancia mediante la prueba de exposición oral controlada negativa en medio hospitalario, ya que algunos pacientes con EREA tampoco toleran los coxibs. También deben ser advertidos que la aplicación tópica de un AINE (bien cutánea u ocular, por

ejemplo) puede determinar exacerbaciones asmáticas. Los pacientes deben de recibir información escrita sobre los fármacos permitidos. Estos pacientes toleran sin problemas todos los derivados opiáceos (74).

2. Tratamiento de las enfermedades respiratorias de base. Evaluación conjunta del paciente con EREA en Alergología, Neumología y ORL. Como norma general, debe evaluarse la vía respiratoria inferior en todos los pacientes diagnosticados de poliposis nasosinusal (PN), dado que los que presentan asma asociada suelen tener una peor percepción del control de su enfermedad debido a la persistencia y gravedad de los síntomas nasosinusales asociados. La publicación en el 2001 del documento ARIA introdujo el concepto de “vía respiratoria única” o “una vía respiratoria, una enfermedad”. En este sentido, debe entenderse que el proceso inflamatorio crónico de base afecta a toda la vía respiratoria y por tanto condiciona la estrategia de diagnóstico y tratamiento (75).

En este escalón asistencial se debería confirmar el diagnóstico de PN y establecer su gravedad y extensión, mediante endoscopia nasal y TC (tomografía computarizada) de senos paranasales, e indicar el tratamiento médico o valorar el quirúrgico, según la medicina basada en pruebas, por parte del ORL; a continuación, valorar y tratar de forma integral, junto con el alergólogo o neumólogo, las enfermedades asociadas: asma y/o rinitis alérgica (revisiones periódicas según control e indicación de tratamiento médico, inmunoterapia específica y/u omalizumab), y la EREA (valorar la indicación de desensibilización a AAS). El impacto del asma, de la rinitis y de la rinosinusitis crónica con PN sobre la calidad de vida del enfermo se pueden medir de forma objetiva, tanto en la visita inicial como posteriormente, para evaluar la eficacia del tratamiento, mediante cuestionarios validados (71).

El tratamiento farmacológico del asma en la EREA no difiere del recomendado para el asma de diferente etiología y que se puede encontrar en las diferentes guías publicadas, teniendo en cuenta que suele ser un asma persistente moderada o grave y/ o de difícil control, y que precisa frecuentemente altas dosis de corticoides inhalados, corticoides orales u Omalizumab para su control. El uso de los antagonistas de receptores de leucotrienos (montelukast) en la EREA resultó eficaz tanto en la rinosinusitis como en el asma, en diferentes estudios controlados con placebo.

Los resultados del tratamiento farmacológico de la rinosinusitis son inferiores a los conseguidos en el asma. Los glucocorticoides intranasales tienen un efecto limitado, en gran parte debido a la dificultad que tienen los fármacos administrados para llegar a los senos paranasales a través de la nariz; por lo que, con frecuencia, es necesario recurrir al uso repetido de corticoides orales.

En ocasiones la patología nasosinusal no responde al tratamiento farmacológico con corticoides, recomendándose el tratamiento quirúrgico. La polipsectomía simple suele ser insuficiente, precisándose procedimientos más extensivos, como la cirugía naso-sinusal endoscópica funcional (cirugía pansinusal/ CENS). La cirugía mejora clínicamente al paciente, provocando no sólo una mejoría en la valoración subjetiva del asma por parte del paciente, sino también un aumento significativo de la función respiratoria y una disminución del uso de corticoides por vía sistémica. Sin embargo, no es infrecuente que persista la anosmia y cierto grado de obstrucción nasal, y la CENS obtiene peores resultados en casos de PN masivas. Además, parece que la CENS tiene peores resultados sobre el control del asma que la cirugía radical (drenaje amplio de las cavidades sinusales con etmoidectomía, antrostomía, esfenoidectomía y resección de los cornetes), que tiene como resultado final una reestructuración de los senos que quedan abiertos a la cavidad nasal, pero al final ambos tipos de abordaje

parecen influir positivamente en la evolución del asma. Sin embargo, no es infrecuente que en los enfermos con EREA persista la anosmia y un cierto grado de obstrucción nasal, y la CENS obtiene peores resultados en casos de PN masivas. En todo caso, la mejoría posquirúrgica se ve limitada por la frecuencia de las recidivas, más habitual en los pacientes con EREA que en los que toleran AINE. Por término medio, los pacientes con EREA que no se desensibilizan requieren la reintervención de los pólipos cada 3 años (71).

Dado que el tratamiento médico-quirúrgico clásico resulta muchas veces insuficiente para conseguir el control óptimo de la PN, en los últimos años se ha intensificado la investigación sobre la patogenia de la PN con el fin de identificar nuevas líneas terapéuticas. La mayoría de los estudios muestran proliferación inflamatoria de eosinófilos y elevación de la IgE específica y total local, así como un número elevado de mastocitos desgranulados. Se ha comprobado el papel que las elevadas cantidades de IgE policlonal pueden tener en la patogenia de la PN, por lo que se está probando con cierto éxito el tratamiento con Omalizumab, un anticuerpo monoclonal anti-IgE comercializado para el tratamiento del asma alérgica grave (76). MC Vennera y cols. demostraron que el tratamiento con omalizumab durante 16 meses de promedio (15-28 meses) contribuyó a mejorar o al menos estabilizar la poliposis nasal en 19 pacientes con asma grave concomitante, sin necesidad de nuevas cirugías (77). Estos resultados preliminares fueron posteriormente confirmados en un ensayo clínico doble ciego controlado con placebo (78). La poliposis no deja de ser una indicación fuera de ficha técnica, por lo cual no se puede generalizar su uso, pero hay bastante evidencia para considerar el omalizumab como una opción terapéutica en pacientes con EREA grave, asma coexistente y que no responden a otros tratamientos o tienen contraindicaciones para la desensibilización a aspirina.

3. Desensibilización a aspirina. Una de las opciones terapéuticas en el asma exacerbada por aspirina es la desensibilización crónica a aspirina. Siguiendo a la reacción aguda tras la toma de aspirina, se desarrolla un periodo refractario durante 2 a 5 días. Durante este tiempo los pacientes pueden tomar aspirina sin nuevas reacciones, y si continuáramos administrando aspirina durante semanas, meses o años, ese estado de tolerancia se mantendría. En este proceso se basa la desensibilización a aspirina.

Teóricamente, casi todos los pacientes con EREA pueden ser desensibilizados a la aspirina. Se realiza en medio hospitalario, en pacientes ingresados o ambulatorios (Hospital de Día), bajo estricto control de personal cualificado, con monitorización de constantes vitales y espirométrico y con equipamiento de parada cardiorrespiratoria disponible, dada la probable aparición de reacciones potencialmente graves. La desensibilización está indicada en aquellos pacientes con síntomas bronquiales y nasales no controlados, con múltiples polipectomías, o con necesidad de tratamiento crónico con corticosteroides orales; en pacientes con EREA que precisen tratamiento con AINE para enfermedades específicas (reumáticas, cardiovasculares: profilaxis primaria o secundaria de enfermedad coronaria, tromboembólica, etc.) y en mujeres con síndrome antifosfolípido (SAF) y EREA que estén embarazadas o deseen estarlo (79-82).

Las principales características clínico-biológicas del endotipo EREA aparecen resumidas en la Tabla 2.

Tabla 2. Los parámetros usados para la definición del endotipo EREA

Características del endotipo	Metodología	EREA
Características clínicas	Historia clínica, exploración física, comorbilidades	Rinosinusitis crónica , poliposis nasosinusal y, a menudo, asma grave
Biomarcadores	Eosinofilia, FeNO, pruebas cutáneas, IgE	Eosinofilia Hiperproducción de Cis-leucotrienos
Exploración funcional respiratoria	Hiperreactividad bronquial, FEV1	Test de exposición oral ó inhalatorio a un AINE positivo
Genética	SNPs y rutas biológicas	HLADPB1*0301 Polimorfismos relacionados con los eicosanoides
Histopatología	Biopsia bronquial/esputo inducido	Patrón eosinofílico
Epidemiología	Prevalencia, riesgo, historia natural	Comienzo adulto Mal pronóstico Prevalencia: 2-5 %
Tratamiento	Respuesta a fármacos clásicos y otros tratamientos	Eficacia de los antagonistas de los leucotrienos Desensibilización y omalizumab
Mecanismo biológico	Ruta biológica específica	Ruta del ácido araquidónico

Tomado de: I Bobolea, J Quiralte. Enfermedad respiratoria exacerbada por antiinflamatorios no esteroideos. En: Asma Grave. P Barranco, S Quirce Eds. Luzan 5 S.A. 2013: ISBN 978-84-7989-759-8: 131-50.

1.3. Utilidad de los Biomarcadores no invasivos en el asma

Generalidades.

La **inflamación bronquial** es la base subyacente del asma, y su control es el objetivo a largo plazo que debe perseguir el tratamiento. De este hecho derivan los continuos esfuerzos que se dirigen a la estandarización de distintas técnicas (esputo inducido, condensado del aire exhalado) y a la identificación de distintos parámetros, denominados **biomarcadores**, que permitan cuantificar de forma objetiva el tipo y el grado de inflamación. Actualmente se considera prioritaria para la investigación clínica del asma la necesidad de seguir investigando para conseguir la **estandarización de varios biomarcadores de inflamación de la vía aérea**, que deben de ser sencillos, baratos, reproducibles y no invasivos (83). Los biomarcadores (signos físicos o mediciones de laboratorio que sirven como indicadores de la fisiopatología subyacente) podrían ser usados para el diagnóstico, monitorización, predicción de riesgos futuros y selección de tratamientos efectivos.

En la última década hemos sido testigos de un gran aumento en la literatura sobre biomarcadores no invasivos del asma eosinofílica. La esperanza es que, en el futuro cercano, esos biomarcadores puedan ayudar a identificar fenotipos de respondedores de terapias específicas, principalmente biológicas. Los potenciales biomarcadores de enfermedad mediada por Th2 incluyen los **eosinófilos en esputo y en sangre periférica, el FENO y la periostina** (84). Los datos actuales que apoyan el uso de estos biomarcadores en la práctica clínica no son claros. No se sabe si un solo biomarcador o una combinación de ellos puedan proveer mayor utilidad. Muy pocos biomarcadores se han propuesto para la enfermedad no eosinofílica, por lo que existe

claramente la necesidad de identificarlos.

El **FeNO** parecía de entrada muy útil para el diagnóstico de la inflamación eosinofílica de la vía aérea, para predecir la respuesta a esteroides y monitorizar la inflamación de la vía aérea en el asma, sin embargo a lo largo de los años su valor predictivo se ha demostrado ser insuficiente (85, 86). Las guías de la ERS/ATS del 2014 para el asma grave no recomendaban el uso del FENO para guiar la terapia. Las guías GINA del 2014/2015 establecieron que el FENO no podía ser recomendado para decidir si tratar o no a los pacientes con posible asma y que el tratamiento guiado por FENO no se recomendaba para la población general de asmáticos (2).

Espujo inducido

La posibilidad de analizar el grado de inflamación bronquial a través de la evaluación de las muestras de esputo es bien conocida. Las limitaciones iniciales debidas a dificultades en su obtención y análisis se solventaron en la década de los años 90. El estudio del esputo en el control del asma ha recuperado por lo tanto su importancia durante los últimos años, al resolverse el problema de la obtención de muestras mediante la técnica del esputo inducido con inhalación de suero salino hipertónico (induce expectoración y mejora la calidad de la muestra) y por la mejora en el procesado de la muestra mediante la adición de ditiotreitól (DTT), que permite obtener citocentrifugados que mejoran la calidad de los recuentos celulares y de una fase líquida en la que es posible la cuantificación de quimiocinas y mediadores. El análisis del esputo obtenido mediante ésta técnica es reproducible y válido para el estudio de la inflamación de la vía aérea, y en conjunto ofrece información superior al lavado bronquial o broncoalveolar, con la ventaja de no ser invasivo, es más barato y rápido, y las secreciones obtenidas están más concentradas. Estudios de estandarización de la prueba demostraron que la cuantificación del porcentaje de eosinófilos era

reproducibile, permitía diferenciar entre asmáticos y controles sanos o sujetos con otras enfermedades respiratorias, y se modificaba de forma inversa el estado de la enfermedad, incrementándose al empeorar la situación clínica y a la inversa (87-89).

Se establecieron valores de normalidad en el porcentaje de eosinófilos en esputo de adultos y niños, y se demostró la superioridad del seguimiento de los valores de eosinofilia en esputo frente a las guías de manejo de asma en el seguimiento a largo plazo de sujetos asmáticos (23, 90, 91).

El análisis de las muestras de esputo inducido puede desempeñar un papel relevante en el manejo práctico y rutinario del paciente con asma bronquial. Sin embargo, la técnica de esputo inducido no se ha difundido en la práctica clínica habitual, lo que es con toda probabilidad consecuencia de que, a pesar de ser un procedimiento sencillo y económico, su realización es laboriosa, consume tiempo y requiere formación por el técnico y colaboración por el paciente, para obtener una muestra de calidad (89). Dada la elevada prevalencia de la enfermedad, el procedimiento de inducción de esputo no parece aplicable en la práctica a la totalidad de asmáticos.

No obstante, la tendencia actual a individualizar la enfermedad intentando identificar sus fenotipos, permite distinguir una serie de casos que bien por sus cualidades de gravedad o presentación atípica, se beneficiarán de la utilización de esta técnica. Por ello, contar con la disponibilidad de la técnica, al menos en los centros de referencia de estudio del asma, o en Unidades de asma grave, sería de gran utilidad, y así lo recomienda el consenso ERS/ATS 2014 sobre manejo del asma grave en pacientes adultos (2).

Periostina

Esta proteína de matriz extracelular fue denominada en base a su expresión en el ligamento periodontal y en el periostio de ratones. Es miembro de la familia de las fascilinas I (FAS I), tiene un peso molecular de 90 kDa, y cumple un rol crucial en la fibrosis subepitelial y en el remodelado de tejidos. El gen POSTN que codifica la periostina se encuentra sobreexpresado en el epitelio respiratorio de pacientes asmáticos (40). Las células epiteliales bronquiales y los fibroblastos a nivel bronquial secretan periostina en respuesta a IL-4 e IL-13 para mediar la síntesis de colágeno, fibrogénesis y la activación del factor de crecimiento beta. Además, la periostina es producida por los eosinófilos una vez que éstos han sido estimulados por la IL-4 y IL-13 que secretan los linfocitos, monocitos y macrófagos tras la exposición a un alérgeno. De una manera autocrina, la periostina es capaz de actuar sobre los eosinófilos estimulando su adhesión y reclutamiento en el epitelio respiratorio. También la periostina puede actuar sobre receptores de los macrófagos para la producción de metaloproteinasas (18, 92, 93).

La periostina se posicionó fuertemente como un biomarcador emergente no invasivo asociado con la inflamación eosinofílica y al fenotipo molecular Th2-alto a raíz de la publicación en el año 2011 del ensayo clínico de Corren et al (94), cuando a las 12 semanas de tratamiento se observó una mejoría significativa en el FEV1 prebroncodilatador y de la tasa de exacerbaciones en los pacientes tratados con lebrikizumab (AcMo anti-IL 13) en comparación con el grupo placebo. El efecto fue significativamente mayor en los pacientes cuyos niveles pretratamiento de periostina circulante estaban por encima de la mediana.

Poco después, el estudio de Jia et al (25) identificó la periostina sérica como marcador biológico sistémico de eosinofilia en las vías respiratorias, en asmáticos

graves no controlados. En un modelo de regresión logística, la periostina en suero fue el mejor predictor de eosinofilia tisular y en esputo, mostrando superioridad a la presencia de eosinófilos en sangre, IgE, y FeNO. Sin embargo, en un reciente estudio que incluyó pacientes con asma leve a moderada y que fue replicado en una pequeña cohorte de asmáticos más graves, la periostina no guardó una relación significativa con la presencia o ausencia de eosinofilia en el esputo. Por el contrario, el número de eosinófilos en sangre sí se mostró como un potente predictor de eosinofilia en la vía aérea (punto de corte: 270, AUC 0.89) (26).

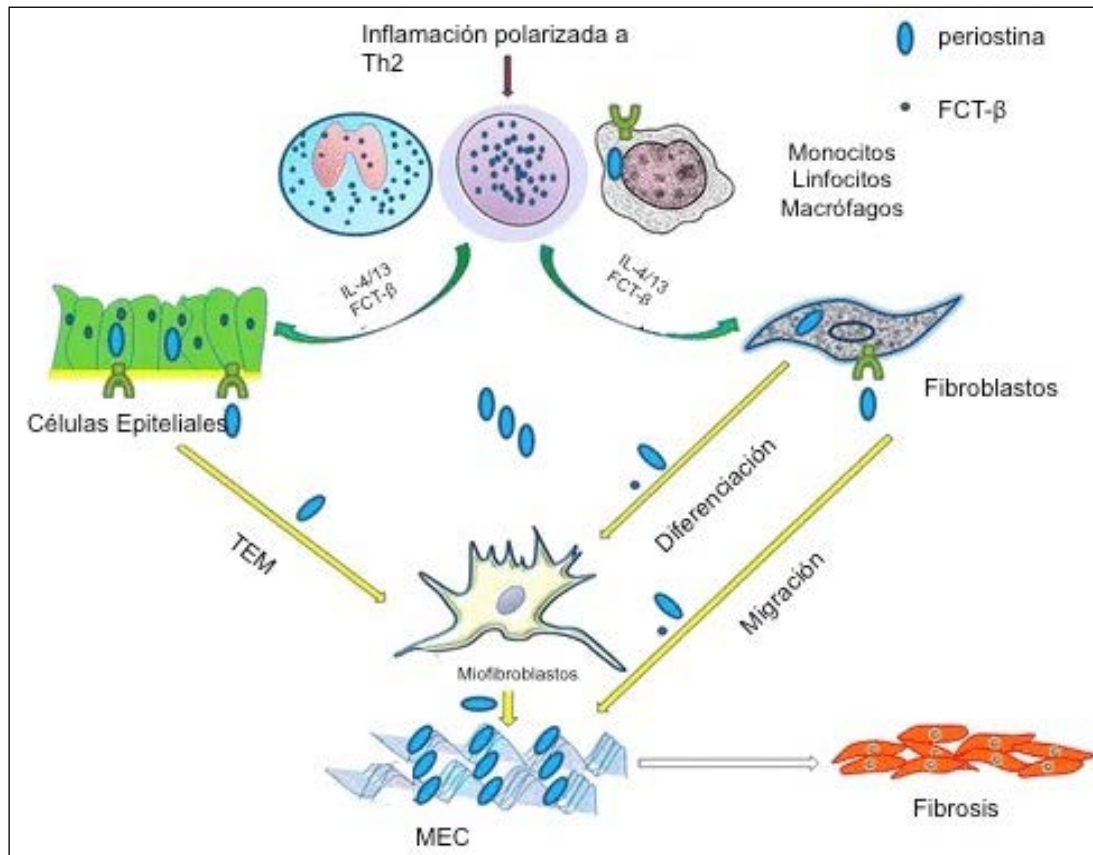
Al parecer, igual que había ocurrido con el FeNO, la periostina sérica no es un buen predictor de la eosinofilia en el esputo inducido, con lo cual en centros especializados hay que disponer de ambas mediciones para caracterizar bien a los pacientes con asma grave. Además, la periostina es fácilmente medible en el sistema circulatorio mediante kits de ELISA específicos, pero le falta especificidad para el asma, estando elevada en varias enfermedades no Th2 y es producida por otros tipos celulares además del epitelio de la vía aérea. La periostina en esputo podría representar un biomarcador más específico de asma que la periostina sérica.

Sin embargo, la periostina se está estableciendo en los últimos años como **un biomarcador de remodelado** de la vía aérea, medible por **métodos no invasivos**. Sus niveles séricos se correlacionan positivamente con la obstrucción fija al flujo aéreo, sin embargo su papel y sus mecanismos de acción están lejos de esclarecerse completamente (95-96). En lo que se refiere al papel de la periostina en la fibrosis del epitelio respiratorio, la inflamación polarizada a la vía Th2, que conlleva al reclutamiento de IL-4, IL-13 y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), estimulan la producción de periostina por parte de los fibroblastos y de las células del epitelio respiratorio, que se promueve la diferenciación de fibroblastos en

miofibroblastos, la migración de fibroblastos y producción de matriz extracelular (105).

Ver Figura 4.

Figura 4. Papel de la periostina en el proceso patológico de la fibrosis subepitelial.



Adaptado de (98): Li Wet al. Periostin: its role in asthma and its potential as a diagnostic or therapeutic target. Respiratory Research.2015;16(1):57.

TSLP

Durante muchos años, se consideró que el asma estaba mediada predominantemente por una respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, cada vez más se reconoce que la inmunidad innata también juega un papel importante en la fisiopatología, gracias a la comunicación entre el sistema inmune innato y el adaptable. Las respuestas inmunes de tipo 2 en el asma, sabemos ahora, son iniciadas por las

citocinas denominadas "alarminas" después de la exposición a una agresión externa, como por ejemplo: contaminantes, infecciones virales y alérgenos. Las alarminas son citocinas tales como IL-25, IL-33 y la linfopoyetina tímica estromal (thymic stromal lymphopoietin- TSLP) (99-100). Estas citoquinas derivadas de las células epiteliales activan las células presentadoras de antígeno (células dendríticas y células NK) para inducir una respuesta inmunitaria adaptativa Th2. Las células T (Th0) se activan a través de la exposición al antígeno y posteriormente se diferencian en un fenotipo Th1 o Th2, dependiendo de un rango de factores coestimuladores, incluyendo la dosis de antígeno presentado y la presencia de citocinas locales (particularmente el IL-4) (100-101) (ver Figura 1). La expresión de IL-4 es clave para la polarización de Th2 in vitro, aunque se ha demostrado que la diferenciación de células Th2 puede ocurrir en ausencia de IL-4 in vivo (102-103). Las células Th2 migran al epitelio de las vías respiratorias ya la mucosa subepitelial, donde segregan las citocinas de tipo 2 IL-5 e IL-13, que desempeñan un papel central en la fisiopatología de la enfermedad y contribuyen a los signos distintivos del asma: síntesis de IgE, fibrosis subepitelial, remodelación bronquial e hiperreactividad de las vías respiratorias (103-104). Además de esta respuesta adaptativa que conduce a la polarización de la célula auxiliar T, IL-25, IL-33 y TSLP activan directamente los ILC2s para secretar grandes cantidades de IL-5 e IL-13 (108). Curiosamente, las ILC2s pulmonares pueden producir también pequeñas cantidades de IL-4 después de la estimulación in vivo con IL-25 e IL-33 (106), pero aún no está claro si esto representa una interfaz activa entre mecanismos inmunes innatos y adaptativos.

Dada la creciente evidencia, los mediadores derivados de células epiteliales han surgido recientemente como actores clave para desencadenar la inflamación celular local y la remodelación bronquial. Varios estudios publicados en los últimos años

empezaron a nombrar la TSLP como un potente inductor de las respuestas de tipo T2.

TSLP, una citoquina similar a IL-7, fue originalmente clonado de una línea de células del estroma tímico, de allí su nombre (107-109). El gen humano TSLP se localiza en el cromosoma 5q22 cerca del cluster de citocinas Th2 (110,111).

Las variantes genéticas de la TSLP se han relacionado con enfermedades atópicas como la dermatitis atópica, el asma, la rinitis alérgica y la esofagitis eosinofílica, postulando la TSLP como una citoquina clave en la inflamación T2 y una posible nueva diana terapéutica para el asma (112, 113).

En cuanto a la EREA, estudios recientes han informado que el patrón de expresión de citocinas podría diferenciar el fenotipo asma grave eosinofílica con tolerancia a la aspirina del asma eosinofílica grave asociada a EREA. De hecho, varias observaciones han demostrado que el interferón Gamma (IFN- γ) y la interleuquina 4 (IL-4) se encuentran sobreexpresados en las vías respiratorias de pacientes con EREA, lo que quiere decir una mezcla de inflamación Th1 y Th2 (114, 115).

Además, en la EREA, la PGD2 derivada de mastocitos se ha demostrado ser un efector mayor de las respuestas inmunes T2 desencadenadas por la TSLP. La desregulación de este sistema innato contribuye significativamente a la fisiopatología de la EREA, como se ha reportado recientemente (116, 117). Con lo cual nos planteamos estudiar por primera vez el posible papel de la TSLP en este endotipo de asma, en el intento de valorar nuevas opciones terapéuticas futuras para los pacientes con EREA, ya que varios ensayos clínicos con anticuerpos monoclonales anti-TSLP están actualmente en curso (118).

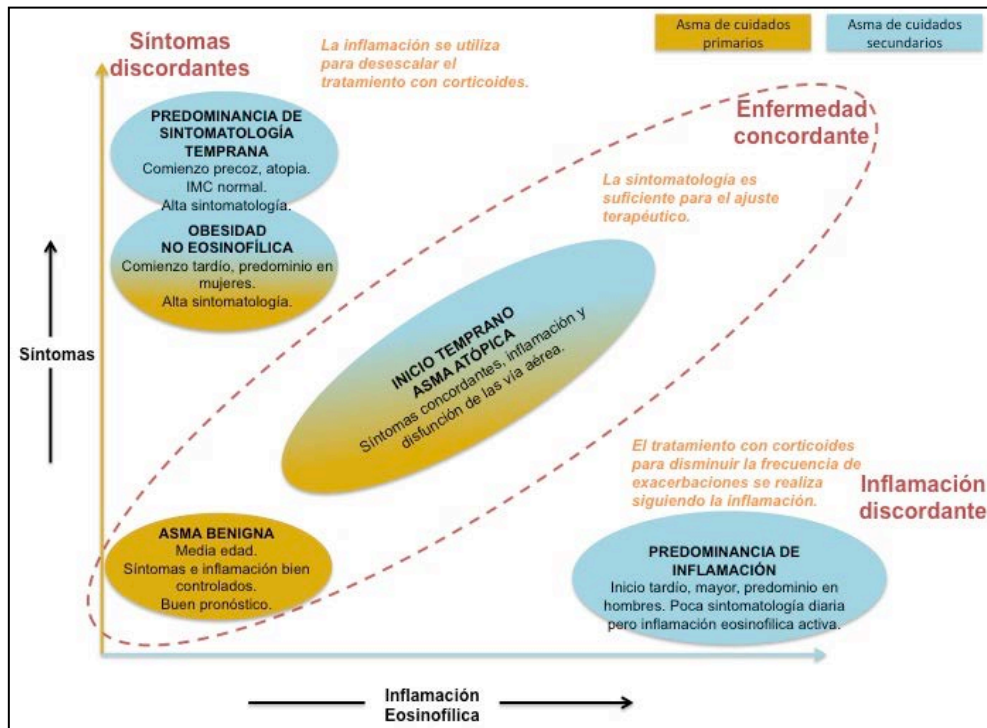
1.4. Abordaje actual del asma grave

Abordaje "sin hipótesis previa" hacia la medicina de precisión: diagnóstico y tratamiento por feno-endotipos

Los primeros intentos de fenotipar el asma se enfocaron a la dualidad del asma alérgica (extrínseca) versus la no alérgica (intrínseca). Otros métodos de clasificación se han basado en una sola variable clínica o demográfica, en una única hipótesis, como el asma de inicio precoz versus el tardío, el asma inducida por ejercicio, el asma relacionada con la obesidad, el asma relacionada con el tabaco, etc., pero todas ellas han sido pobremente caracterizadas. La clasificación del asma ha cambiado, desde el uso de variables únicas hacia un enfoque molecular.

El análisis de *clusters* jerárquicos ha sido el siguiente abordaje, un nuevo método estadístico, menos sesgado, que intenta agrupar a los pacientes según amplios rangos de variables preseleccionadas, como la edad de inicio, la atopia, el sexo, la severidad de la obstrucción y otras (43, 44). El análisis de *clusters* usa múltiples algoritmos matemáticos para lograr dos objetivos: 1) cuantificar las similitudes entre sujetos dentro de un grupo basado en variables preespecificadas y 2) agrupar en *clusters* en los que esas similitudes sean más fuertes entre los sujetos del mismo *cluster* y más débiles en relación a sujetos de otros *clusters*. En uno de los mejores análisis de *clusters*, publicado por Haldar et al en 2008 (119), se integran la expresión de la sintomatología y la inflamación, porque ambas son pertinentes y modificables dentro de la multidimensionalidad del asma. Los *clusters* encontrados en este estudio se acercan un poco a los endotipos propuestos posteriormente por Lotvall en 2011- ver Figura 5.

Figura 5. Resumen de los fenotipos identificados utilizando un análisis de *clusters* en población asmática.



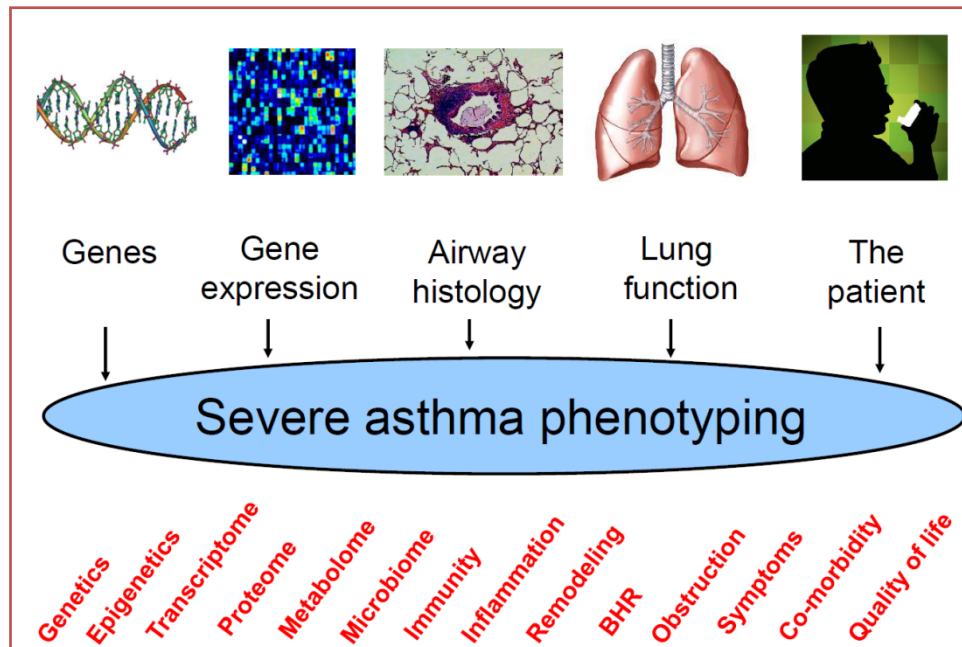
Modificado de: Haldar P, et al. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. Am J Respir Crit Care Med. 2008;178: 218–224.

Sin embargo, a pesar de las formas no sesgadas de elaboración de algoritmos, los fenotipos/grupos resultantes de estos análisis carecen de utilidad en la práctica clínica habitual, puesto que muchos pacientes asmáticos quedan sin poder ser ajustados a ninguno de estos grupos, y además sin llevar consecuentemente a una diferente forma de tratar a estos pacientes.

Por lo tanto, la tendencia estratégica actual es el **abordaje integral**, o la visión paralela, que engloba características clínicas e información biológica proporcionada por "multiómicas" (genómica, proteómica, metabolómica etc). Es un abordaje sin hipótesis previa, tal como se recomienda además en la última Guía internacional de consenso ERS/ATS para la definición, evaluación y tratamiento del asma grave (KF Chung

2014)- ver Figura 6, cuyo objetivo es caracterizar lo mejor posible un paciente en concreto, con el fin de individualizar su tratamiento (2).

Figura 6. Abordaje global para la caracterización del paciente con asma grave.



Tomada de (2): Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, et al. *International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma*. Eur Respir J 2014. (2)

La **medicina personalizada** podría definirse como un modelo estructurado que busca individualizar el cuidado de la salud con decisiones médicas y productos dirigidos a los pacientes individualmente, con el mayor grado de detalle. El cada vez mayor avance en los conocimientos de los mecanismos moleculares del asma y la consecuente identificación de biomarcadores ha permitido expandir los enfoques terapéuticos (34). Más que identificar a un subfenotipo muy específico, un biomarcador, o un grupo de biomarcadores, debería usarse para identificar un patrón de inflamación, lo que podría tener mejor valor predictivo. Este enfoque está muy bien ejemplificando en la literatura con el caso del mepolizumab, que fue uno de los primeros biológicos que se aplicaron en una población seleccionada (aquellos con fenotipo eosinofílico) (28).

O bien el estudio EXTRA identificó, en un análisis retrospectivo, un grupo de asmáticos con biomarcadores elevados (FENO, eosinofilia periférica y periostina sérica) que mostraba mayor disminución en la tasa de exacerbaciones con el uso del omalizumab, comparado con aquellos con dichos biomarcadores bajos (27).

Manejo integral de los pacientes con asma grave en la Unidad interdisciplinar de asma del Hospital Universitario La Paz

Según la Guía Española para el Manejo del Asma (GEMA), los pacientes con asma grave deberían ser diagnosticados y controlados en consultas especializadas por personal sanitario con experiencia (3). Después de una evaluación completa en consultas especializadas, sólo en un 55% de enfermos con sospecha inicial de asma de control difícil se confirma el diagnóstico (Nivel de evidencia C, GEMA 2015).

Los consensos actuales coinciden en unos supuestos razonables: asegurar el diagnóstico, identificar y tratar las comorbilidades, y valorar (y, en su caso, optimizar) el cumplimiento terapéutico.

También hay coincidencia en la necesidad de identificar el feno-endotipo de asma grave en cada caso individual. El consenso SEPAR y el de ATS/ERS diferencian asma alérgica grave, asma eosinofílica grave de inicio tardío, asma neutrofílica de inicio en la edad adulta y asma no atópica asociada con la obesidad. Incluir a un paciente en uno de estos fenotipos permite inferir un comportamiento en el futuro y, sobre todo, establecer pautas terapéuticas precisas (4).

La evaluación sistemática del asma grave, de sus comorbilidades y de los factores desencadenantes, y la identificación del feno-endotipo, se realizan de forma protocolizada en las dos consultas monográficas de Asma grave, pertenecientes a los servicios de Alergología y Neumología, que constituyen el núcleo de la Unidad de

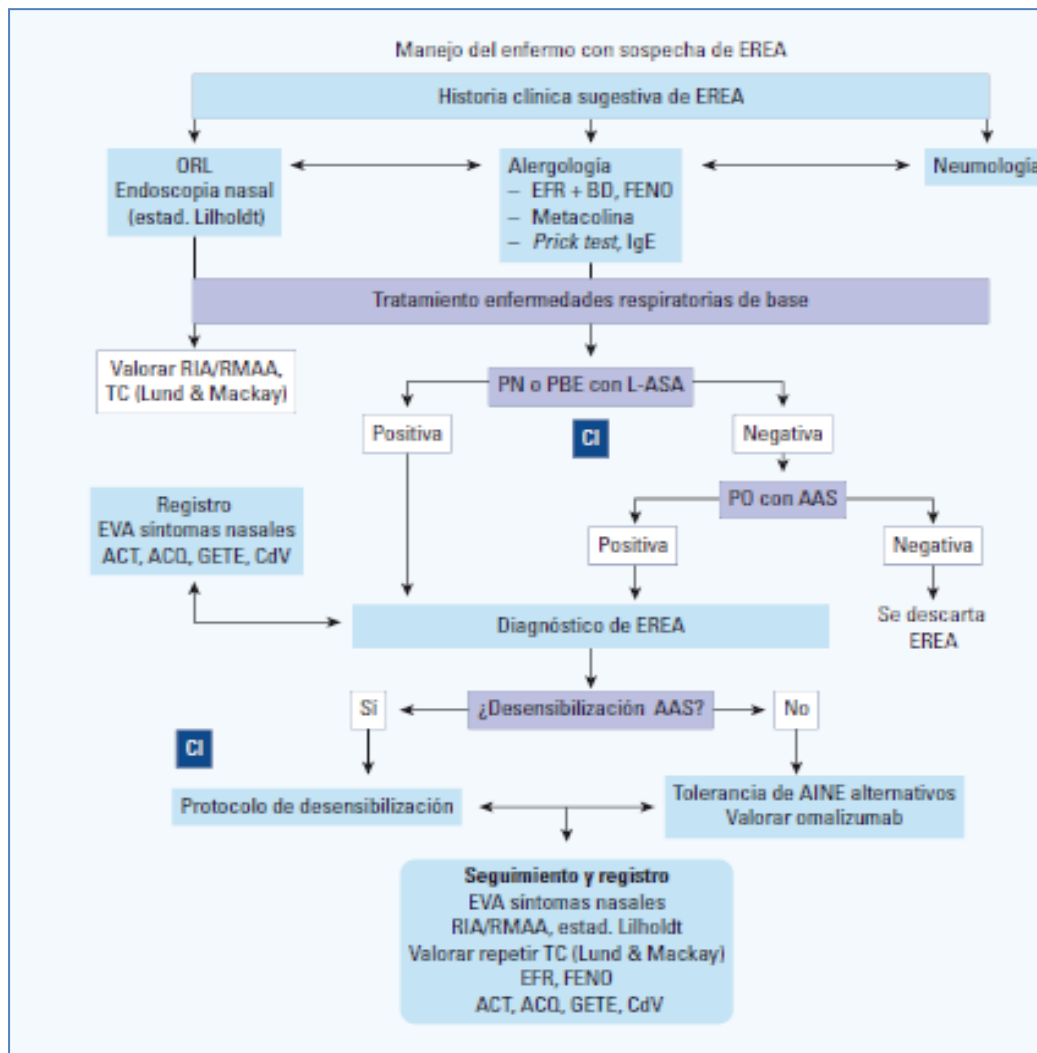
Asma Grave multidisciplinar del Hospital Universitario La Paz. La Unidad de Asma Grave (UAG) fue constituida en el año 2010 con el fin de optimizar la asistencia y los gastos en el manejo de pacientes con asma grave, y fue acreditada con el nivel de excelencia por la SEPAR y a SEAIC en el año 2015.

La investigación sobre los mecanismos subyacentes de la enfermedad asmática y de biomarcadores de respuesta que podrían ayudar a elegir el mejor tratamiento para un paciente determinado han sido desde siempre prioritarios en esta Unidad, pionera en la realización rutinaria del esputo inducido y de medición de periostina en pacientes con asma grave en España.

Manejo interdisciplinar de la EREA y la desensibilización a aspirina

Dado que la EREA es un endotipo de asma grave bastante prevalente, su manejo específico ha sido siempre relevante dentro de la Unidad de asma grave. Al inicio de mi contrato Río Hortega participé en la elaboración, coordinación y puesta en práctica de una vía clínica diagnóstico-terapéutica completa e interdisciplinar de la EREA, que se firmó entre los servicios de Alergología, Neumología y ORL y entró en vigor el 26/05/2010. De esta forma, los pacientes se beneficiaron de un diagnóstico y un tratamiento rápidos y eficaces. En la **Figura 7** se expone el algoritmo completo, diagnóstico-terapéutico interdisciplinar, para el manejo de EREA que empleamos en el Hospital La Paz para el manejo de estos enfermos (120).

Figura 7. Manejo del enfermo con sospecha de EREA.



Tomada de: I Bobolea, S Quirce. Manejo interdisciplinario de la poliposis nasosinusal en la enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina. Rev Rinol 2012; 12 (1):40-53.

Leyenda Figura 7: En la primera consulta el médico (ORL, Alergólogo, Neumólogo) realiza una historia clínica detallada y las exploraciones complementarias pertinentes específicas para cada especialidad, e instaura el tratamiento adecuado. Para realizar el diagnóstico definitivo de la EREA, mediante técnicas de exposición controlada con la aspirina, el paciente debe ser remitido al Servicio de Alergología, donde posteriormente en los pacientes con EREA confirmada se realiza también la desensibilización a aspirina en los casos indicados. El manejo de la EREA es multidisciplinario (ORL-Alergia-Neumología). Dentro del seguimiento habitual se

realizarán todas las visitas y las exploraciones complementarias consideradas necesarias para el buen control del paciente.

Abreviaciones: AAS, ácido acetilsalicílico; ACQ, Asthma Control Questionnaire; ACT, Asthma Control Test; AINE, antiinflamatorio no esteroideo; AQLQ, Asthma Quality of Life Questionnaire; BD, prueba de broncodilatación; CdV, calidad de vida; CI, consentimiento informado; EFR, expiración funcional respiratoria; EREA, enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina; Estadificación Lilholdt (mediante endoscopia nasal, ref. 25) y Lund & Mackay (TAC de senos paranasales, ref. 26.) de la poliposis nasosinusal; EVA, escala visual analógica; FeNO, fracción exhalada de óxido nítrico; GETE, Global Evaluation of Treatment Effectiveness scale; IgE: inmunoglobulina E; PO ASA, prueba de exposición oral controlada con aspirina; PN o PBE L-ASA, prueba de exposición inhalatoria nasal ó bronquial con acetilsalicilato de lisina; RA, rinometría acústica: RMAA, rinomanometría anterior activa.

Desensibilización con aspirina

Una opción terapéutica en pacientes con EREA no controlada es la desensibilización crónica a aspirina, el único tratamiento que parece modificar la historia natural de la enfermedad. Siguiendo a la reacción aguda tras la toma de aspirina, en estos pacientes se desarrolla un periodo refractario durante 2 a 5 días. Durante este periodo de tiempo, los pacientes pueden tomar aspirina sin nuevas reacciones. Después de este tiempo, la toma de aspirina puede precipitar nuevos ataques de asma. Sin embargo, si continuáramos administrando aspirina durante semanas, meses o años, ese estado de tolerancia se mantendría, fenómeno en el que se basa la desensibilización.

La desensibilización está indicada en aquellos pacientes con síntomas bronquiales y nasales no controlados, con múltiples polipeptomías, o con necesidad de tratamiento crónico con corticosteroides orales; en pacientes con EREA que precisen tratamiento con AINE para enfermedades específicas (reumáticas, profilaxis primaria o secundaria de enfermedad coronaria/ tromboembólica) y en mujeres con síndrome antifosfolípido (SAF) y EREA que estén embarazadas o deseen estarlo (79, 80).

El procedimiento de la desensibilización se debe iniciar en un momento de control óptimo del asma, desde el punto de vista clínico y espirométrico. El paciente no tiene que suspender su medicación habitual, lo contrario, si no está tomando montelukast se debería introducir este fármaco antes de iniciar la desensibilización, ya que protege frente al broncoespasmo intenso inducido por aspirina: los pacientes presentan menos episodios y más leves de broncoespasmo, mientras que los síntomas nasales y oculares permanecen y son reconocibles durante la provocación.

Se realiza en medio hospitalario, bajo estricto control de personal cualificado, con monitorización de constantes vitales y control espirométrico, y con equipamiento de parada cardiorrespiratoria disponible, dada la probable aparición de reacciones potencialmente graves. Se administran dosis crecientes, con un intervalo de 3 horas, individualizando en cada caso según la gravedad del asma, con controles espirométricos previos a cada dosis y cada 30 minutos, o en el caso de que aparezcan síntomas. Estos suelen ocurrir con dosis entre 60 y 100 mg, entre 30-180 min después de la administración. Se debe pautar el tratamiento adecuado y la resolución ocurre entre las 2 y las 24 horas. Cuando el paciente esté estable, pero no antes de 3 horas, se reinicia el protocolo con la última dosis tolerada. Teóricamente, casi todos los pacientes con EREA pueden ser desensibilizados a la aspirina. En general, cuanto menor sea la dosis umbral, más difícil es conseguir la desensibilización y cuanto más leve sea la reacción inicial, más fácil. La fase de tolerancia se puede alcanzar tras un único episodio de broncoespasmo, pero si el paciente es muy sensible y reacciona con dosis bajas de AAS, es necesario repetir la provocación de 2 a 6 veces hasta lograr la tolerancia.

Se considera el paciente desensibilizado si se alcanza la dosis de 650 mg AAS y no presenta clínica ninguna ni caída del FEV₁. Después el paciente debe seguir tomando aspirina diariamente, 650 mg cada 12 horas durante un mes, y luego reducir progresivamente según el control y el efecto deseado. La dosis mínima para prevenir recidiva de pólipos y mejorar el olfato es de 300 mg/día, pero no suele mejorar el control del asma, en este caso siendo la dosis óptima de 325 mg/12 horas. Si se suspende la aspirina por la razón que sea durante más de 48 horas habrá que reiniciar el proceso de desensibilización, por haber podido perder la tolerancia. Lo más habitual esto ocurre en el caso de cirugía programada, por lo cual en los pacientes que requieren polipsectomía se pospone la desensibilización hasta 3-4 semanas después de la misma.

La desensibilización produce mejoría significativa de los síntomas inflamatorios de vías respiratorias tanto altas como bajas. Mejora el olfato, disminuye el número de visitas a Urgencias y de hospitalizaciones por asma, aumenta la calidad de vida para la rinitis y sobre la percepción del asma, a partir de tan solo las 4 semanas de tratamiento. En los pacientes adultos con EREA y poliposis nasal, la desensibilización seguida de dosis diarias de aspirina, a largo plazo, ha reducido la necesidad de polipsectomías y de corticosteroides tópicos y sistémicos. También permite la administración de cualquier otro AINE sin riesgo de presentar nuevos síntomas.

Los efectos adversos más frecuentes son la gastritis y los trastornos de la coagulación. En un estudio extenso a largo plazo de 174 pacientes, el 14% de los pacientes tuvieron que abandonar el proceso de desensibilización debido a las reacciones adversas digestivas, sobre todo epigastralgia y hemorragia digestiva. El uso concomitante de inhibidores de la bomba de protones disminuye el riesgo de estos efectos adversos.

La desensibilización es una técnica segura, más aún tras la aparición en el mercado del montelukast a finales de la década de los 90, probablemente porque, al ser la reacción dosis-dependiente, las exacerbaciones asmáticas que ocurren durante la desensibilización son siempre más leves que las reacciones iniciales referidas por el paciente tras tomar la dosis terapéutica de aspirina o del AINE involucrado (79-82).

La **patogénesis de la desensibilización** a aspirina no está clara. Se ha observado que la desensibilización crónica disminuye los niveles séricos de triptasa y la síntesis de LTB₄ por parte de los monocitos periféricos al nivel de los controles normales. También disminuye la síntesis de los cis-LT, objetivada por la disminución de los niveles urinarios de LTE₄, pero no alcanza a los niveles de los sujetos sanos (121). Dadas las numerosas actividades antiinflamatorias del AAS, no se puede descartar que la administración de dosis altas de este fármaco ejerza efectos clínicamente beneficiosos independientes del fenómeno de la desensibilización. El AAS es capaz de inhibir la síntesis o activación de algunos factores de transcripción como el NF-κB y el STAT6, que modulan las respuestas inflamatorias de las vías aéreas. El STAT6 regula, entre otras, la síntesis de algunas citoquinas implicadas en el asma como la IL-4 y la IL-13, y la disminución de las cuales podría tener un efecto antiinflamatorio, lo que se ha confirmado en un estudio reciente (122). La desensibilización a largo plazo (6 meses) induce supresión de la IL-4 (citoquina responsable de la expresión de los receptores de cis-LT en linfocitos T y B), en otras palabras tiene un efecto anti-Th2, y también de la

MMP-9, enzima proinflamatoria que se relaciona con el reclutamiento de células inflamatorias (neutrófilos y eosinófilos) en la vía aérea (123).

En conclusión, la desensibilización a aspirina es un tratamiento con una base inmunológica evidente, y sus mecanismos podrían ser similares a otros tratamientos inmunomoduladores ampliamente utilizados en Alergología, como la inmunoterapia específica con alérgenos o el omalizumab. Además ha demostrado su eficacia en estudios amplios a largo plazo, es barata, segura y bien tolerada en los casos seleccionados correctamente, siendo recomendada por varios artículos de consenso (consenso EAACI/ENDA 2011 [74]) y guías de práctica clínica recientes (guía POLINA [71], GEMA 4.1 [3]).

1.5. Justificación e hipótesis del trabajo

El reto en el tratamiento del asma reside precisamente en su heterogeneidad. Varios anticuerpos monoclonales desarrollados para el tratamiento del asma están actualmente en ensayos clínicos de fase II o III, muchos de ellos dirigidos frente a dianas T2. Identificar por lo tanto el fenotipo/endotipo de asma en cada paciente, profundizar en la fisiopatología y definir biomarcadores específicos para cada endotipo e incluso predictores de respuesta, constituyen ahora prioridades en la investigación traslacional en el asma. Ya que el objetivo final es personalizar, individualizar el tratamiento, para mejorar el pronóstico del paciente y optimizar los recursos sanitarios. Desde el año 2011, la periostina se postuló como biomarcador emergente predictor del fenotipo eosinofílico y T2 alto, y de la respuesta al anticuerpo monoclonal anti-IL 13 lebrikizumab en pacientes con asma grave. Por otro lado, un endotipo concreto de pacientes con asma grave, los EREA, son habitualmente los más difíciles de manejar, pero se pueden beneficiar de un tratamiento específico y efectivo, la desensibilización a aspirina. Los mecanismos de la desensibilización se desconocen, y el tratamiento, aunque muy efectivo, es poco utilizado en la práctica clínica por su complejidad y efectos secundarios. Con lo cual aclarar los mecanismos de la desensibilización podría identificar otras dianas terapéuticas para los pacientes con EREA, postulándose los anticuerpos monoclonales anti –TSLP, actualmente en ensayos fase III, como una posible opción terapéutica futura.

Hipótesis:

Nuestra hipótesis es que la periostina se correlaciona con los fenotipos inflamatorios y moleculares identificados en los pacientes atendidos en la consulta de Asma grave, lo que la convertiría en un biomarcador útil para orientar el tratamiento.

En pacientes desensibilizados a aspirina postulamos que la TSLP, una molécula efectora proinflamatoria, disminuye en caso de mejoría clínica, lo que apoyaría la utilidad de los nuevos fármacos anti-TSLP en la EREA.

2. OBJETIVOS

1. Identificar los fenotipos inflamatorios y moleculares de los pacientes atendidos en una Unidad interdisciplinar de asma grave.
2. Investigar el papel de la periostina en esputo inducido como biomarcador de los distintos fenotipos de asma grave.

3. En el subgrupo de pacientes con asma grave endotipo EREA:
 - 3.1. Valorar la utilidad terapéutica (eficacia y seguridad) de su tratamiento específico, la desensibilización a aspirina.
 - 3.2. Profundizar el conocimiento actual sobre la patogénesis de la EREA y de la desensibilización con aspirina mediante análisis de biomarcadores en esputo inducido, pre y post- desensibilización.

3. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

Esquema-resumen del capítulo 3.

3.1. Para cumplir los **objetivos 1-2**, realizamos un **estudio observacional prospectivo** en pacientes con asma grave atendidos en la Unidad interdisciplinar del Hospital Universitario La Paz en los años 2011-2012, reclutados de forma consecutiva según **criterios de inclusión/exclusión** estrictos que se detallan.

Material y métodos:

- Se recogieron datos demográficos y clínicos. Se clasificaron a los pacientes en distintos **fenotipos**, según una serie de variables definidas en base a la evidencia científica. Se realizó una serie de **comparaciones de variables** continuas y categóricas entre los subgrupos identificados.
- La **perioestina** se midió en todos los pacientes, en los sobrenadantes de esputo inducido, y se analizó su **correlación** con parámetros clínicos, inflamatorios, de función pulmonar, y entre los distintos fenotipos.

3.2. En una segunda fase del estudio, con el fin de cumplir el **objetivo 3**, en el **subgrupo de pacientes diagnosticados de intolerancia a AINE (endotipo EREA)** realizamos un **estudio prospectivo intervencionista**, abierto, no controlado con placebo, para valorar la eficacia, seguridad y los mecanismos de su tratamiento específico, la desensibilización a aspirina.

Material y métodos:

- **Criterios de inclusión/exclusión** específicos de la desensibilización, que se detallan.
- **Parámetros analizados:** parámetros clínicos, espirométricos, inflamatorios: se compararon antes y después de la desensibilización (al mes y a los 6 meses). Se analizó la dinámica de los marcadores de inflamación (PGD2, PGE2, LTC4, TSLP) en muestras de esputo inducido en los momentos especificados arriba, y su correlación con los parámetros clínicos y de función pulmonar.
- Descripción del Manejo de los pacientes con EREA (ver Anexos I, II)
- Descripción del procedimiento de la Desensibilización a aspirina (Anexo III)

3.3. Otros métodos empleados en ambos estudios y otras consideraciones comunes:

- Consideraciones generales; Definiciones; Algoritmos diagnósticos: algoritmo diagnóstico del asma grave; evaluación sistemática del asma grave; exploraciones complementarias realizadas.

3.4. Descripción de las mediciones y procedimientos específicos empleados en ambos estudios: Espirometría basal y test broncodilatador; FeNO; Esputo inducido, inducción y procesamiento; medición de biomarcadores en esputo mediante ELISA.

3.5. Aspectos éticos.

3.6. Análisis estadístico.

3.1. Para cumplir los Objetivos 1-2, realizamos un estudio observacional prospectivo, con los siguientes Criterios de inclusión:

- Pacientes > 18 años, diagnosticados de asma grave según los criterios ATS/SEPAR/GEMA 2009 en la Consulta monográfica de Asma Grave (conjunta Alergología-Neumología)
- Firma de consentimiento informado para la inducción del esputo y la participación en el estudio
- FEV₁ post-broncodilatador > 50% del teórico y > 1 litro el día de la inducción del esputo, tomando el tratamiento de mantenimiento habitual para el asma.

Criterios de exclusión:

- Fumadores activos o ex-fumadores > 10 paquetes/año
- Los pacientes con infección respiratoria en las 4 semanas previas a la inducción del esputo.

Material y Métodos

- Se recogieron datos demográficos y clínicos: edad, sexo, índice de masa corporal (IMC), tabaquismo, las características clínicas del asma (edad de inicio, exacerbaciones del asma, control de los síntomas y medicación relacionada con el asma.), las condiciones coexistentes y las comorbilidades como la hipersensibilidad a la aspirina/ antiinflamatorios no esteroideos (AINE), la rinosinusitis crónica, Poliposis naso-sinusal, ansiedad-depresión, reflujo gastroesofágico, rinitis alérgica y obesidad.
- Realizamos pruebas cutáneas en *prick-test*, pruebas de función pulmonar (espirometría basal forzada, prueba broncodilatadora, pletismografía,

DLCO), fracción de óxido nítrico exhalado (FeNO), esputo inducido, análisis de sangre (hemograma con recuento absoluto de eosinófilos en sangre periférica, IgE sérica total, IgE específicas alérgenos)

- Se clasificaron a los pacientes en distintos fenotipos, según las variables especificadas más abajo: asma de inicio temprano o tardío; asma y obesidad; fenotipos moleculares Th2 alto y Th2 bajo; fenotipos inflamatorios: eosinofílico, mixto granulocítico, paucigranulocítico, no eosinofílico; asma con limitación crónica o variable al flujo aéreo.
- Con el fin de caracterizar mejor los fenotipos de asma identificados, se realizó una serie de comparaciones de variables continuas y categóricas entre los subgrupos identificados
- La **periostina** se midió en todos los pacientes, en los sobrenadantes de esputo congelados a -80°C utilizando un kit comercial (DuoSet ELISA-R & D Systems, Minneapolis, MN), tal como se detalla en el punto 3.4. Se analizó la correlación de la periostina con los distintos fenotipos de asma.

Se utilizaron las siguientes variables para las Definiciones de los Fenotipos (38-41):

- **Edad de inicio** del asma: < o bien ≥ 12 años respectivamente
- **Obesidad:** índice de masa corporal (IMC) > 30 kg/ m²
- **Fenotipo Th2 alto:** definido como IgE total >100 UI/ml (CAP KU/L, ThermoFisher, Uppsala, Sweden) y eosinofilia periférica >140 eosinófilos/mm³;
Th2 bajo: si cumple uno o ninguno de estos dos criterios.

- **Asma eosinofílica:** definida como eosinofilia en esputo inducido $>2\%$; no eosinofílica: eosinófilos en esputo $<2\%$.
- En cuanto a los **fenotipos inflamatorios**, se definieron por recuento diferencial de células en esputo inducido de acuerdo con los puntos de corte utilizados en el programa SARP (Severe asthma research programme)(44) para eosinófilos(2%) y neutrófilos (40%). Diferenciamos así: fenotipo eosinofílico puro (eosinófilos $> 2\%$, neutrófilos $>40\%$), mixto granulocítico (eosinófilos $> 2\%$, neutrófilos $>40\%$), paucigranulocítico (eosinófilos $<2\%$, neutrófilos $<40\%$), no eosinofílico (eosinófilos $<2\%$, neutrófilos $>40\%$).
- **Obstrucción/ limitación fija al flujo aéreo (LCFA):** definida según el estudio TENOR (124) como índice $FEV_1/FVC \leq 70\%$ post-broncodilatador en dos determinaciones separadas por un año (teniendo en cuenta que todos los pacientes estaban recibiendo altas dosis de corticosteroides inhalados, > 1000 mcg de fluticasona o equivalente/ día).

3.2. En una segunda fase del estudio, con el fin de cumplir el Objetivo 3, en el subgrupo de pacientes diagnosticados de intolerancia a AINE (EREA), realizamos un **estudio prospectivo intervencionista abierto no controlado con placebo**, para valorar la eficacia, seguridad y los mecanismos de su **tratamiento específico, la desensibilización a aspirina.**

Diseño del estudio:

- Se incluyeron todos los pacientes >18 años diagnosticados mediante provocación positiva con aspirina de EREA, con indicación y sin contraindicaciones de la

desensibilización a aspirina, que fueron desensibilizados según un protocolo de 3-4 días (protocolo original de Stevenson modificado[81]) y posteriormente tomaron aspirina a diario durante un mínimo de 6 meses.

-Para el estudio fueron obligatorias: la Visita basal (antes de iniciar la desensibilización), revisión al mes, y a los 6 meses del inicio de la desensibilización.

En todos estos momentos se obtuvo una muestra de esputo inducido.

Parámetros analizados:

- Evolución de los parámetros clínicos: se evaluaron antes y después de la desensibilización (al mes y a los 6 meses): síntomas nasales (EVA), control del asma (ACQ7, ACT), calidad de vida (RSDI, AQLQ), parámetros espirométricos, FeNO.
- Dinámica de los marcadores de inflamación detallados más abajo en muestras de esputo inducido en los momentos especificados arriba, y su correlación con los parámetros clínicos y de función pulmonar.

La hoja de recogida de datos de la Visita 1, basal antes de la desensibilización, y de las visitas de seguimiento, se adjuntan como **Anexos I, II.**

Material y métodos:

-Obtención y análisis de muestras de esputo para:

1. Análisis de subpoblaciones celulares: recuento visual microscopio óptico (88-89)
2. Análisis de los niveles de eicosanoides en el sobrenadante del esputo inducido: Cys-LT (C4, D4, E4), LTC4 aparte, PGE2, PGD2- mediante kits de ELISA específicos para cada mediador (ver apartado “ELISA” en el punto 3.4).
3. Estudio de citoquinas en esputo: TSLP- mediante kit de ELISA específico (ver apartado “ELISA” en el punto 3.4).

- **Descripción del Manejo de los pacientes con EREA**

En la **Figura 7** se detalla el algoritmo completo, diagnóstico-terapéutico interdisciplinar, para el manejo de EREA, que empleamos en el Hospital La Paz para los pacientes incluidos en este estudio (120).

Los pasos a seguir eran los siguientes:

1. La presencia de EREA debe sospecharse ante cualquier paciente que presente una historia de rinosinusitis crónica y/o poliposis nasal, especialmente si es asmático. En estos pacientes hay que insistir dentro de la anamnesis sobre las reacciones tras toma de aspirina u otros AINE. En la primera consulta el médico (ORL, Alergólogo, Neumólogo) realiza una historia clínica detallada y las exploraciones complementarias pertinentes específicas para cada especialidad, e instauro el tratamiento adecuado, que comprende, por una parte, el tratamiento médico-quirúrgico de las enfermedades de base (asma, poliposis, rinosinusitis) y sus eventuales complicaciones y, por otra parte, la evitación de AINE.
2. Para realizar el diagnóstico definitivo de la EREA, mediante técnicas de exposición controlada con la aspirina, el paciente debe ser remitido al Servicio de Alergología, donde, si no se había realizado previamente, en la primera visita se aclara también el diagnóstico de asma, mediante pruebas objetivas de afectación funcional respiratoria: espirometría más prueba broncodilatadora. El estudio de la fracción exhalada de óxido nítrico (FENO) se utiliza de rutina para cuantificar de forma no invasiva el grado de inflamación bronquial.

3. Se realiza la provocación bronquial inespecífica con metacolina para confirmar/ descartar el diagnóstico de asma en los pacientes con espirometría normal y prueba broncodilatadora negativa.
4. Para el diagnóstico de EREA se empieza con la provocación bronquial (PB con L-ASA), y si resulta negativa se procede a la PO con ASA. Las dos provocaciones se pueden realizar con una distancia de una semana entre ellas. Si cualquiera de las dos provocaciones es positiva, se confirma la EREA. Si las dos resultan negativas, se descarta la enfermedad.
5. En los pacientes con EREA confirmada se valoró la indicación de la desensibilización a aspirina. Si la desensibilización estuviese contraindicada, o se realiza pero posteriormente el paciente tiene efectos adversos y no la tolera, se debe comprobar la tolerancia de analgésicos/AINE alternativos (inhibidores de la COX-2, meloxicam, paracetamol etc) y se valora la indicación de omalizumab en pacientes con asma grave concomitante, si no se había realizado previamente.
6. El manejo de la EREA es multidisciplinario (ORL-Alergia-Neumología). Dentro del seguimiento habitual se realizaron todas las visitas y las exploraciones complementarias consideradas necesarias para el buen control del paciente. Para evaluar la eficacia de los tratamientos indicados se emplearon también otros métodos subjetivos (escala visual analógica de síntomas) u objetivos (cuestionarios validados de control del asma o sobre la calidad de vida relacionada con la rinosinusitis/ poliposis nasal y el asma).
7. En el caso de los pacientes con diagnóstico previamente establecido de EREA se citaban directamente en Alergología para valorar la indicación de desensibilización a aspirina.

8. Seguimiento y registro: tal como se explica en la Figura 6. La hoja de recogida de datos de la Visita 1, basal antes de la desensibilización, y de las visitas de seguimiento, se adjuntan como **Anexos I, II**. Los datos se introdujeron en una base de datos anonimizada para su posterior análisis estadístico.
9. El protocolo detallado de la desensibilización a aspirina se adjunta en el **Anexo III**. A continuación se explican los aspectos generales de este procedimiento.

- **Descripción del procedimiento de la Desensibilización a aspirina (81, 82)**

El procedimiento de la desensibilización en los pacientes asmáticos se debe iniciar en un momento de control óptimo del asma, desde el punto de vista clínico y espirométrico. Condición mínima y obligatoria: FEV₁>60% del teórico y >1,5 L, y en el momento de iniciar la desensibilización \geq 90% del mejor previo. El paciente no tiene que suspender su medicación habitual, lo contrario, si no está tomando montelukast este fármaco se debería introducir antes de iniciar la desensibilización, ya que protege frente al broncoespasmo intenso inducido por aspirina: los pacientes presentan menos episodios y más leves de broncoespasmo, mientras que los síntomas nasales y oculares permanecen y son reconocibles durante la provocación.

Se realiza en medio hospitalario, en pacientes ingresados o ambulatorios (Hospital de Día), bajo estricto control de personal cualificado, con monitorización de constantes vitales y espirométrico y con equipamiento de parada cardiorrespiratoria disponible, dada la probable aparición de reacciones potencialmente graves. Se administran dosis crecientes, con un intervalo de 3 horas, individualizando en cada caso según la gravedad del asma. Una pauta orientativa sería: 25, 50, 75, 100, 150, 325, 650 mg, administrados a lo largo de 3-4 días según tolerancia. Se realizan controles

espirométricos previos a cada dosis y cada 60 minutos, o en el caso de que aparezcan síntomas. Estos suelen ocurrir con dosis entre 60 y 100 mg, entre 30 -180 min después de la administración. Se debe pautar el tratamiento adecuado y la resolución ocurre entre las 2 y las 24 horas. Cuando el paciente esté otra vez estable, pero no antes de 3 horas, se reinicia el protocolo con la última dosis tolerada.

Se considera el paciente desensibilizado si se alcanza la dosis de 650 mg AAS y no presenta clínica ninguna ni caída del FEV₁. Después el paciente debe seguir tomando aspirina diariamente, 650 mg cada 12 horas durante un mes y luego reducir progresivamente según el control y el efecto deseado. La dosis mínima para prevenir recidiva de pólipos y mejorar el olfato es de 300 mg/día, pero no suele mejorar el control del asma, en este caso siendo la dosis óptima de 325 mg/12 horas. Si se suspende la aspirina por la razón que sea durante más de 48 horas habrá que reiniciar el proceso de desensibilización, por haber podido perder la tolerancia. Lo más habitual esto ocurre en el caso de cirugía programada, por lo cual en los pacientes que requieren polipsectomía se pospone la desensibilización hasta 3-4 semanas después de la misma.

Se han identificado varios factores de riesgo para desarrollar broncoespasmo grave (>30% descenso del FEV₁) durante la desensibilización: edad 31-40 años, menos de 10 años de evolución de la EREA, FEV₁<80% teórico, historia de visitas a Urgencias por asma no relacionadas con toma de AINE. En estos pacientes se debería de valorar un ciclo corto de corticosteroides orales antes y durante la desensibilización, y/ o llevar a cabo el proceso de desensibilización en una unidad de alta vigilancia (REA, UCI) (79).

3.3.Otros métodos empleados en ambos estudios y otras consideraciones

comunes:

Consideraciones generales:

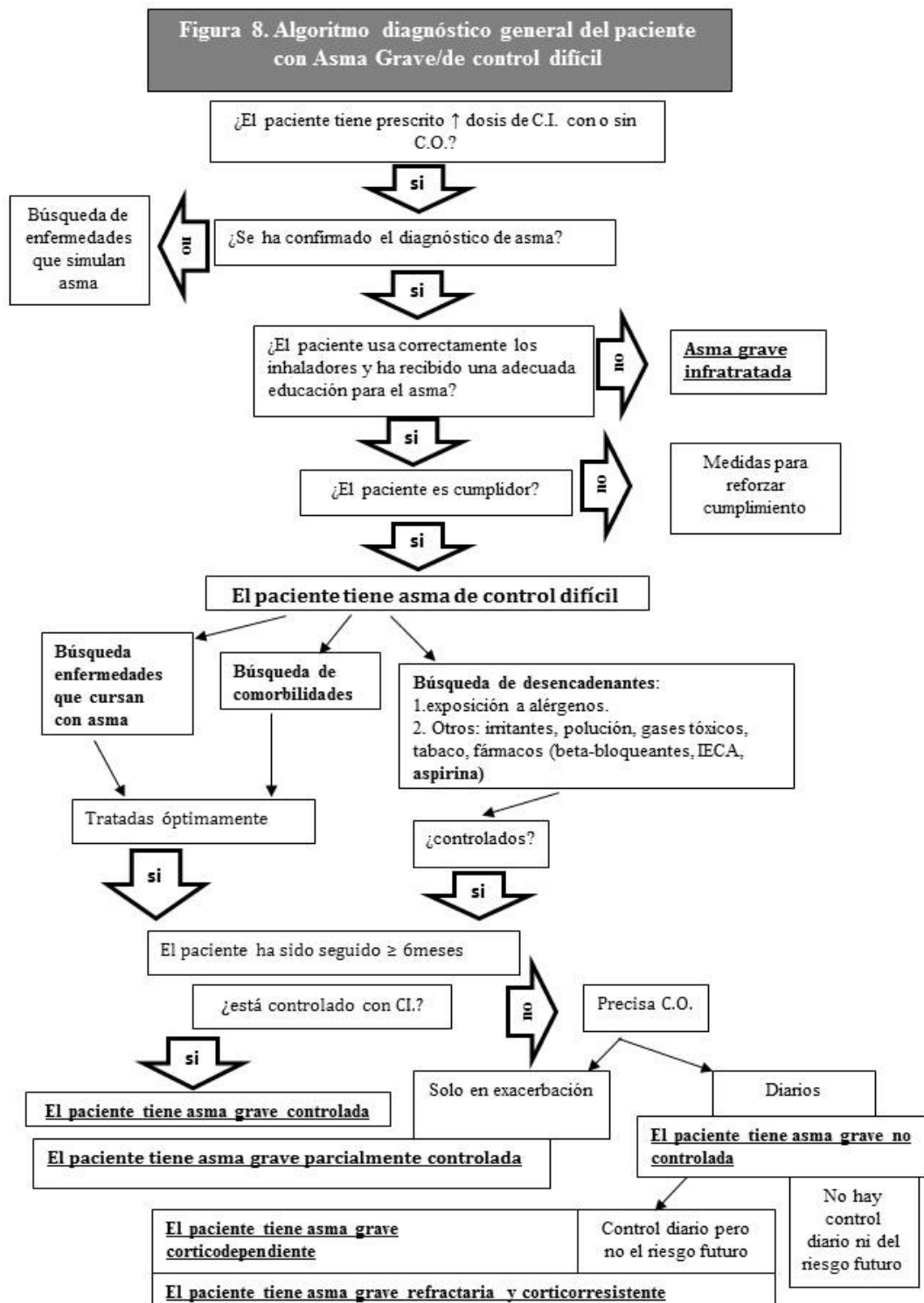
- Se creó una **Base de Datos** clínica, basada en la evidencia, empleando el programa HpDoctor del hospital La Paz.
- En todos los pacientes, previo a la inducción de esputo, se descartó cualquier infección respiratoria activa, incluso la tuberculosis (mediante historia clínica, prueba de Mantoux y Rx/ TACAR tórax reciente).

Definiciones (125):

- Control del asma: ACT ≥ 20 y ausencia de agudizaciones (126).
- Agudización/ exacerbación asmática: eventos caracterizados por un cambio sobre el estado previo del paciente. Estos eventos se identifican clínicamente por sobrepasar la variación habitual día-a-día que puede notar el enfermo.
- Exacerbación grave: Deterioro clínico acompañado de descenso del FEV1 $>20\%$ o bien suficiente para motivar un tratamiento con esteroides sistémicos mínimo 3 días o la hospitalización del paciente.

Algoritmos diagnósticos:

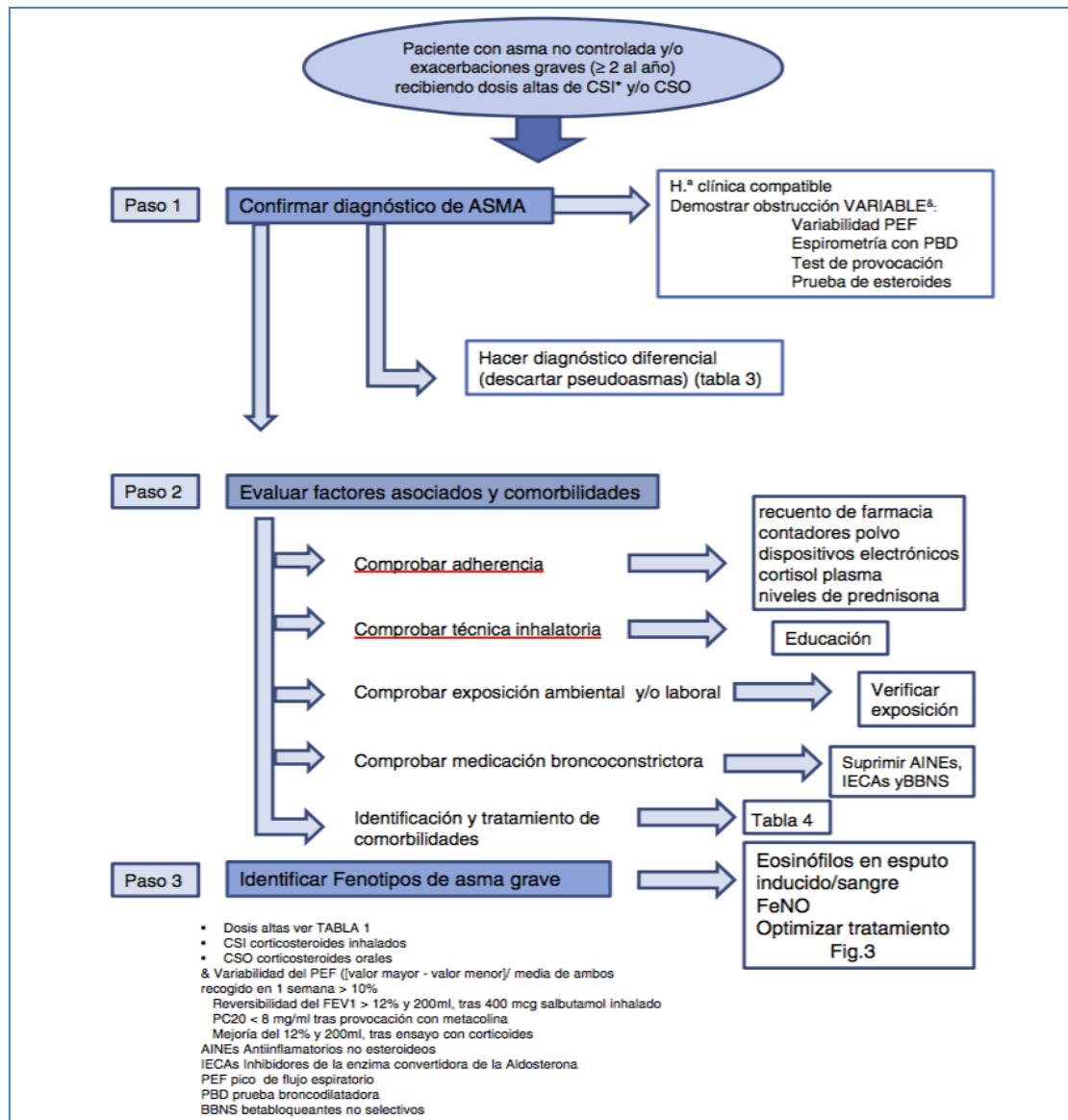
- **Asma**: diagnosticada ante la presencia de sibilancias, disnea, sensación de opresión torácica o tos, más alguna de las siguientes: test broncodilatador positivo (incremento $>12\%$ en el FEV1 a los 15 min después de la inhalación de 400 mcg de salbutamol); o un test de metacolina positivo (dosis del fármaco requerida para disminuir el FEV1 un 20% -PC20- de <16 mg/ml) o un test de manitol positivo (dosis requerida para disminuir el FEV1 un 15% -PD15- de <635 mg), de acuerdo con los criterios de la American Thoracic Society/GINA/GEMA 2015).
- **Diagnóstico de asma grave**: se realizó siguiendo el Algoritmo propuesto por Barranco P et al, ver Figura 8.
- **Evaluación sistemática del asma grave**: según se ve resumido en la Figura 9.
- Para el **diagnóstico diferencial** y la valoración de **comorbilidades** se realizaron de forma individualizada todos los demás procedimientos diagnósticos incluidos en el protocolo de la Unidad, siguiendo las indicaciones de los consensos de práctica clínica actuales (ver Tabla 3) (4).



Leyenda Figura 8: C.I.: corticoesteroides inhalados; C.O.: corticoesteroides orales.

Adaptada según el Consenso SEAIC, Barranco et al, J Investig Allergol Clin Immunol 2012; Vol. 22(7): 460-475.

Figura 9. Evaluación sistemática del asma grave.



Tomado de (4): Cisneros Serrano C, et al. Normativa SEPAR sobre asma grave no controlada. Arch Bronconeumol 2015.

Tabla 3. Exploraciones complementarias recomendadas para el estudio de otras posibles enfermedades simuladoras de asma grave no controlada.

Análisis en sangre: hemograma y recuento de eosinófilos; inmunoglobulinas y subclases de inmunoglobulinas, autoanticuerpos anti-citoplasma del neutrófilo (ANCA), IgE total, IgE e IgG específica <i>Aspergillus</i> , α -1 antitripsina, hormonas tiroideas. Anti-Ro, anti-La, FR. Dímero-D. Estudio genético fibrosis quística
Radiografía simple de tórax
Electrocardiograma
Respuesta cutánea tardía a <i>Aspergillus</i>
Volúmenes pulmonares, transferencia del CO y gases arteriales
Test del sudor
TC de senos paranasales
TC torácica de alta resolución y cortes espiratorios
Recuento de células inflamatorias en el esputo inducido
Evaluación psicológica
Fibrobroncoscopia con biopsia bronquial
Ph-metría esofágica 24 horas
Laringoscopia durante una exacerbación
Biopsia mediante toracotomía

Tomado de GEMA 4.1. www.gemasma.com(3)

3.4. Descripción de las mediciones y procedimientos específicos empleados.

- Espirometría basal y test broncodilatador: se realizaron de acuerdo (en lo referente a los equipos empleados y a la maniobra) con la normativa SEPAR (127). La espirometría se realizó con un espirómetro Flow Screen (Vyasis Healthcare GmbH, Hoechberg, Alemania). El espirómetro se calibra diariamente con una jeringa de precisión de 3 L (Vitalograph Ltd, Buckingham, Reino Unido). Parámetros de la espirometría: se midieron y registraron el volumen espiratorio forzado en 1 segundo (FEV1), la capacidad vital forzada (FVC), en valor absoluto y como % del predicho, y

las relaciones FEV1 /FVC. Todos los pacientes se sometieron a una prueba broncodilatadora mediante inhalación de 400 mcg de salbutamol pMDI administrado con ayuda de una cámara de inhalación Volumatic.

- **FeNO:** la FENO se midió de acuerdo con las especificaciones técnicas del dispositivo portátil NIOX MINO (Aerocrine AB, Solna, Sweden). Para este estudio se recogió el valor de la FENO obtenida justo antes de la primera espirometría realizada dentro del test de inducción del esputo (128).

- **Espujo inducido:** la inducción y el procesamiento de la muestra se realizaron según las recomendaciones de la ERS (89).

Para la **inducción del esputo:** primero se debe constatar una función pulmonar estable mediante una espirometría basal. Posteriormente se administra un beta-adrenérgico de acción corta y tras 15 minutos se realiza una nueva espirometría, en la cual el FEV1 debe ser superior al 50% del teórico y >1 litro, para poder seguir con la inducción. A continuación, se nebuliza solución salina hipertónica a 4.5% con la ayuda de un nebulizador ultrasónico (*Omron NE-U17*), durante periodos de 5 minutos (máximo 20 minutos de estimulación en total) tras lo cual se estimula al paciente para que tosa y así obtener una muestra de esputo.

Procesamiento dela muestra de esputo: el esputo se procesa con ditiotreitól (DTT) para obtener la dispersión de las células (1 volumen de 0,1 % DTT por volumen de esputo), lo que será necesario para el conteje total y diferencial de células. Al cabo de 15 minutos en agitacion a 37 grados Celsius se mezcla con PBS conteniendo inhibidores

de proteasas. La muestra se filtra a través de un filtro y el sobrenadante se centrifuga a 1700 rpm durante 10 minutos para precipitar las células. El sobrenadante se decanta y congela a -80°C hasta que se requiera para medir los mediadores. De esta forma nos liberamos del DTT que podría interferir en las mediciones de los mediadores que posean puentes disulfuro.

Recuento celular: a) Celularidad total: mediante colorantes vitales (azul trypan) se contarán el número de células totales recuperadas. en cámara Neubauer, la viabilidad y el porcentaje de células escamosas. b) Para el conteo diferencial se realizan citocentrifugaciones utilizando una citocentrífuga Bunsen Cytospin; se tiñen con May-Grünwald-Giemsa; análisis por microscopía con un conteo mínimo de 400 células no escamosas. Reportamos eosinofilia %/mL esputo, Neutrofilia %/mL esputo, % resto de células (89).

- **ELISAs.**

Los biomarcadores se midieron en los sobrenadantes de esputo congelados a -80°C, utilizando kits comerciales específicos para cada mediador. Antes de la prueba, los sobrenadantes de esputo se trataron para eliminar los desechos celulares y otros contaminantes que podrían haber interferido con el ensayo. En todos los pacientes, los niveles de biomarcadores se midieron en sobrenadantes puros por duplicado.

Se realizaron varios experimentos con el fin de analizar el posible efecto del ditioneitol (DTT) sobre las mediciones, y observamos que este compuesto utilizado durante el procesamiento del esputo no tuvo efecto alguno. Para ello, se utilizó como reactivo diluyente el recomendado por el fabricante del kit (BSA al 1% en PBS, pH 7,2, 0,2 µm filtrado), pero añadiendo DTT en concentración similar a la presente en los

sobrenadantes del esputo, y comparamos estos resultados con los obtenidos sin añadir DTT, y no se observaron diferencias significativas.

La **perioquina** se midió utilizando el kit comercial DuoSet ELISA, R & D Systems, Minneapolis, MN. La especificidad de este ensayo de perioquina es del 100% y el límite de detección es de 180 pg/ml.

La **prostaglandina D2, E2 y cisteinil-leucotrieno C4** se midieron mediante Kits ELISA específicos (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI), así como la **TSLP**(R & D Systems, Minneapolis, MN). El coeficiente de variación intra-ensayo se situó entre el 4% y el 8%, y el coeficiente entre los ensayos se situó entre el 4% y el 10%, con una especificidad del 100%. El límite inferior de detección de estos ensayos fue de 8,26 pg / ml (PGE2), 17,1 pg / ml (LTC4), 19,5 pg / ml (PGD2) y 32,5 pg / ml (TSLP), respectivamente.

3.5. Aspectos éticos.

El estudio se desarrolló de acuerdo con los principios éticos de la Declaración de Helsinki, y según las normas de Buena Práctica Clínica y las regulaciones legales vigentes, durante toda su duración. Fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario La Paz.

Todos los pacientes fueron debidamente informados (de forma oral y por escrito) acerca de la naturaleza del estudio, de sus objetivos y de los procedimientos. Todos los pacientes recibieron hojas de información y firmaron el consentimiento informado para participar en el estudio, además de los consentimientos específicos para cada procedimiento empleado (esputo inducido, inducción de tolerancia a fármacos,

provocación bronquial u oral con aspirina)- que eran los habitualmente empleados en el Servicio.

Se especificó por escrito que podían abandonar el estudio en el momento que lo desearan, sin que ello supusiera un perjuicio en la asistencia recibida.

Además, se garantizó la privacidad y la custodia de los datos obtenidos durante el estudio, de acuerdo con la Ley 15/1999. Para ello, los pacientes recibieron un código para su identificación en la base de datos y en las muestras biológicas guardadas, teniendo la IP del estudio solamente una lista con la correspondencia entre los códigos y los datos identificativos de cada paciente.

Las muestras de sangre y esputo inducido: el almacenamiento del sobrenadante de esputo, suero y de células de esputo para su posterior análisis se realizó según lo previsto en la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica.

3.6. Análisis estadístico.

Los datos se analizaron con el software SPSS v11.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). Las variables cualitativas se presentan con su distribución de frecuencias relativas y absolutas. Las variables cuantitativas se resumen con su media, desviación estándar, rango e intervalo de confianza de la media al 95%. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar, excepto para los niveles de FeNO e IgE que se expresan como mediana y rango intercuartil (IQR) ya que no siguieron una distribución normal. La comparación de las variables cuantitativas se basó en el uso de pruebas no paramétricas (prueba de Wilcoxon). Para comparar las variables categóricas se utilizaron la prueba de Chi cuadrado, prueba exacta de Fisher y la prueba de McNemar, previo estudio de las características de la distribución de las variables y según cumplieran las condiciones de distribución normal. Las comparaciones entre los grupos

se realizaron con la prueba t de Student para las variables normalmente distribuidas y con el test U de Mann-Whitney para las variables no distribuidas normalmente. La prueba de Kruskal-Wallis se utilizó para comparar las diferencias entre varios grupos. Para las comparaciones intragrupo de las variables en sangre y sobrenadante de esputo se utilizó el test de Wilcoxon para datos emparejados. Una $p < 0,05$ se consideró significativa.

4. RESULTADOS

Esquema-resumen del capítulo 4.

4.1. Identificación de los fenotipos inflamatorios y moleculares de los pacientes atendidos en una Unidad de Asma grave de alta complejidad

Características clínicas de los pacientes; Fenotipos de asma; Comparaciones de variables entre los fenotipos encontrados.

4.2. El papel de la periostina en esputo inducido como biomarcador de los distintos fenotipos de asma grave.

Correlación periostina-limitación crónica al flujo aéreo- remodelación bronquial.

4.3. Resultados en el subgrupo de pacientes con asma grave endotipo EREA:

4.3.1. La utilidad terapéutica (eficacia y seguridad) de la desensibilización a aspirina.

Características de la muestra; Eficacia y seguridad de la desensibilización; Evolución de los parámetros clínicos analizados.

4.3.2. Análisis de biomarcadores en esputo inducido, pre y post- desensibilización a aspirina.

Eicosanoides; TSLP.

4.1. Identificación de los fenotipos inflamatorios y moleculares de los pacientes atendidos en una Unidad De Asma Grave de Alta Complejidad

Características clínicas de los pacientes

Un total de 62 pacientes diagnosticados de asma grave refractaria siguiendo los criterios ATS (12), con FEV1 > 1 Litro post-broncodilatador y > 50% teórico el día de la inducción de esputo se incluyeron inicialmente en el estudio. La inducción del esputo fue exitosa en 52 pacientes (83%). El resto no expectoró después de 20 minutos de estimulación, o la muestra se consideró inadecuada (células escamosas > 15% y / o viabilidad celular < 70%), por lo cual los pacientes fueron excluidos del estudio.

Las características demográficas, clínicas, pulmonares e inflamatorias de los 52 pacientes finalmente incluidos se presentan en la **Tabla 4**.

En cuanto a las exacerbaciones, un marcador importante de control del asma, se encontró que 92% de los pacientes habían tenido al menos una exacerbación en el año antes de su inclusión en el estudio, pero de hecho la gran mayoría (72% de los pacientes) había tenido al menos 3 exacerbaciones.

Tabla 4. Características demográficas, clínicas, inflamatorias y funcionales de los sujetos estudiados.

	Pacientes con asma grave, n=52
Edad (media, rango)	55 (13-68)
Mujeres	80%
Asma de inicio tardío (>12 años)	80%
IMC (kg/m ² ; media, rango)	28 (20-45.3)
Comorbilidades	
Rinitis/rinosinusitis crónica (RSC)	67%
RSC con pólipos	30%
EREA	20%
Atopia	57%
Fumadores o ex-fumadores, <10 paquetes/año	44%
Activos. 9 pacientes	17%
Ex-fumadores 14 pacientes	27%
ERGE	86.5%
Pruebas de función pulmonar	
FEV ₁ (% teórico, media-rango)	75.8% (34-110)
FEV ₁ /FVC (media-rango)	68% (41-89)
FEV ₁ /FVC post-broncodilator (media, rango)	68.5% (41-91)
Tratamiento actual, n (%)	
LABA/CI	49 (95%)
Antagonista de leucotrienos	31(59%)
Esteroides orales	16 (30%)
Tiotropio	26(50%)
Omalizumab	5 (9%)
Dosis de CI (media mcg fluticasona/ equiv.)	1332
Esteroides orales (media mg cortisona/ equiv.)	25
Control del asma	
ACT score, media (min-max.)	14 (6-23)
Exacerbaciones*	92%
Inflamación	
FeNO (ppb; media, rango)	50.21 (4-224)
Total IgE (IU/mL; media, rango)	288 (3-3698)
Eosinofilia periférica (eos/mm ³)	377 (50-1190)
Periostina en esputo (ng/ml; media, rango)	53.6 (0.1-152)

ACT: Asthma Control Test; CI: corticosteroides inhalados; IgE: Inmunoglobulina E; LABA: long-acting beta-agonists; ppb: partes por billón. * Al menos una exacerbación grave en el año anterior a la inclusión en el estudio.

Tomado de (130): Irina Bobolea, Pilar Barranco, David Romero et al. Sputum periostin in patients with severe asthma and its relationship with asthma phenotypes. Allergy 2015; 70(5):540-6.

Fenotipos de asma

Con el fin de clasificar a los pacientes asmáticos en diferentes fenotipos, se consideraron las siguientes variables: asma de inicio tardío (≥ 12 años) frente a inicio temprano (< 12 años), fenotipos moleculares Th2-alto y bajo, limitación del flujo aéreo crónica (persistente) versus no persistente (variable) (PAFL versus NPAFL, de las siglas en inglés, *persistent* versus *non-persistent airflow limitation*) y asma relacionada con la obesidad (definida como $IMC > 30 \text{ kg / m}^2$). En cuanto a los fenotipos inflamatorios, se definieron por recuento diferencial de células en esputo de acuerdo con los puntos de corte del subestudio SARP para eosinófilos (2%) y neutrófilos (40%) (44).

Cincuenta pacientes tenían eosinofilia de esputo $> 2\%$, de los cuales 71% eran eosinofílicos puros (36 pacientes) y 25% mixtos granulocíticos (13 pacientes). 2 pacientes resultaron no eosinofílicos: 1 paucigranulocítico y otro neutrofílico puro. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Fenotipos de asma identificados.

	Pacientes (%)
Asma relacionada a obesidad	60
Asma de inicio tardío	80
PAFL (limitación crónica al flujo aéreo)	50
Th2 alto	66
Fenotipos inflamatorios esputo inducido:	
-Eosinofílico	71
-Mixto granulocítico	25
-Neutrofílico	2
-Paucigranulocítico	2
Resultados completos esputo inducido:	
Células totales/ ml esputo (media, rango)	1.8 x 10 ⁶ (0.5-5.8x10 ⁶)
% células escamosas	11 (4- 15%)
% eosinófilos	22.7 (1.8-42%)
% neutrófilos	29.8 (6-71)
% resto (predom. macrófagos)	47.5 (16-64%)

PAFL: persistent airflow limitation.

Tomado de (130):Irina Bobolea, Pilar Barranco, David Romero et al. Sputum periostin in patients with severe asthma and its relationship with asthma phenotypes. Allergy 2015.

Con el fin de caracterizar mejor los fenotipos de asma identificados, se realizó una serie de comparaciones de variables continuas y categóricas entre los subgrupos según los fenotipos clínicos y funcionales. Brevemente, los resultados estadísticamente significativos, o bien de otro modo relevantes, se resumen a continuación.

Comparaciones de variables entre subgrupos

- Asma de inicio temprano, <12 años de edad (20% de los pacientes) versus inicio tardío

(80%): se observó un IMC significativamente mayor en asma el inicio tardío (29 versus 22.5 media, $p < 0.05$) (**Figura 10 A**), con un pico significativo de la media (31.5 kg/m²) en los pacientes con asma de inicio en la adolescencia (12-18 años)- **Figura 10B**.

Figura 10A. El asma de inicio tardío se correlaciona con un IMC mayor.

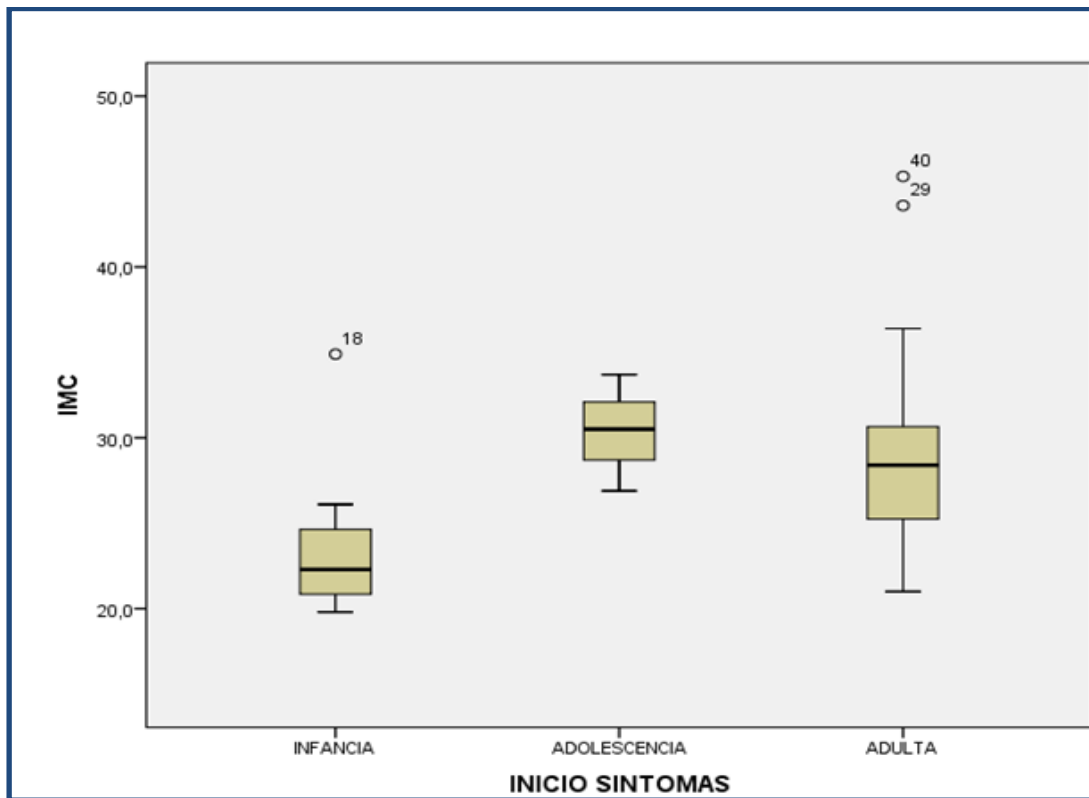
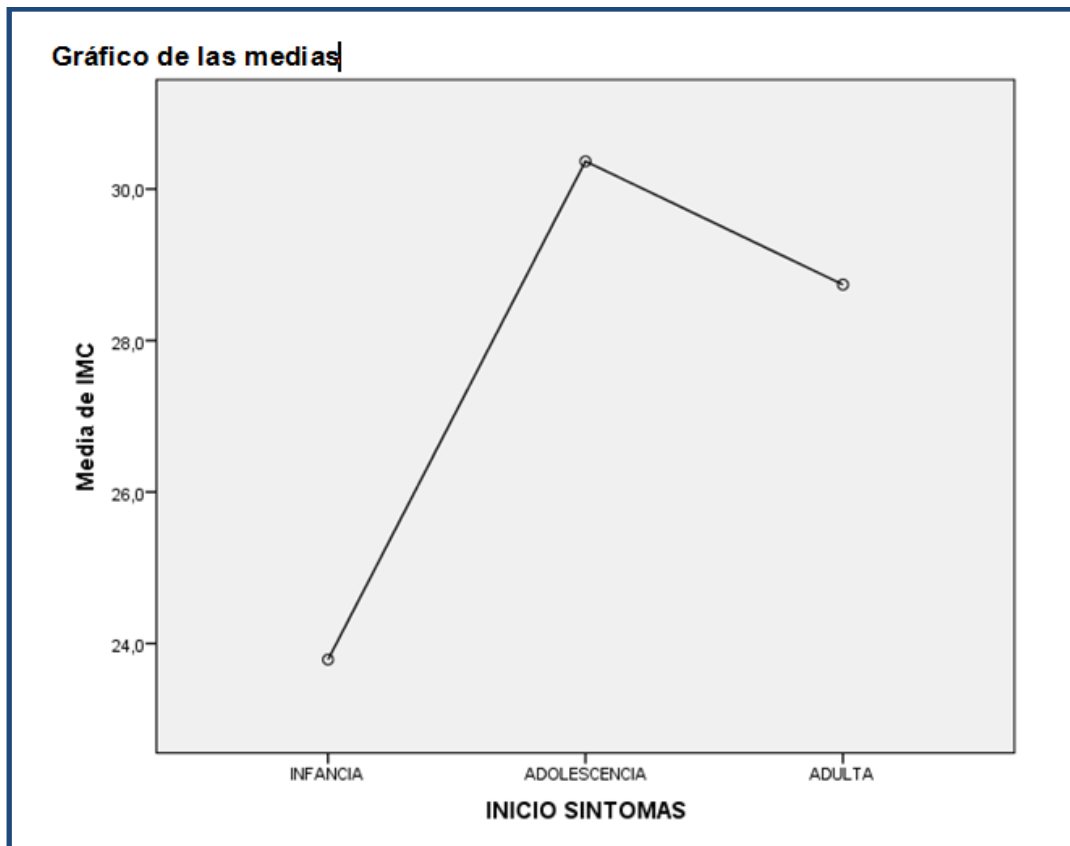
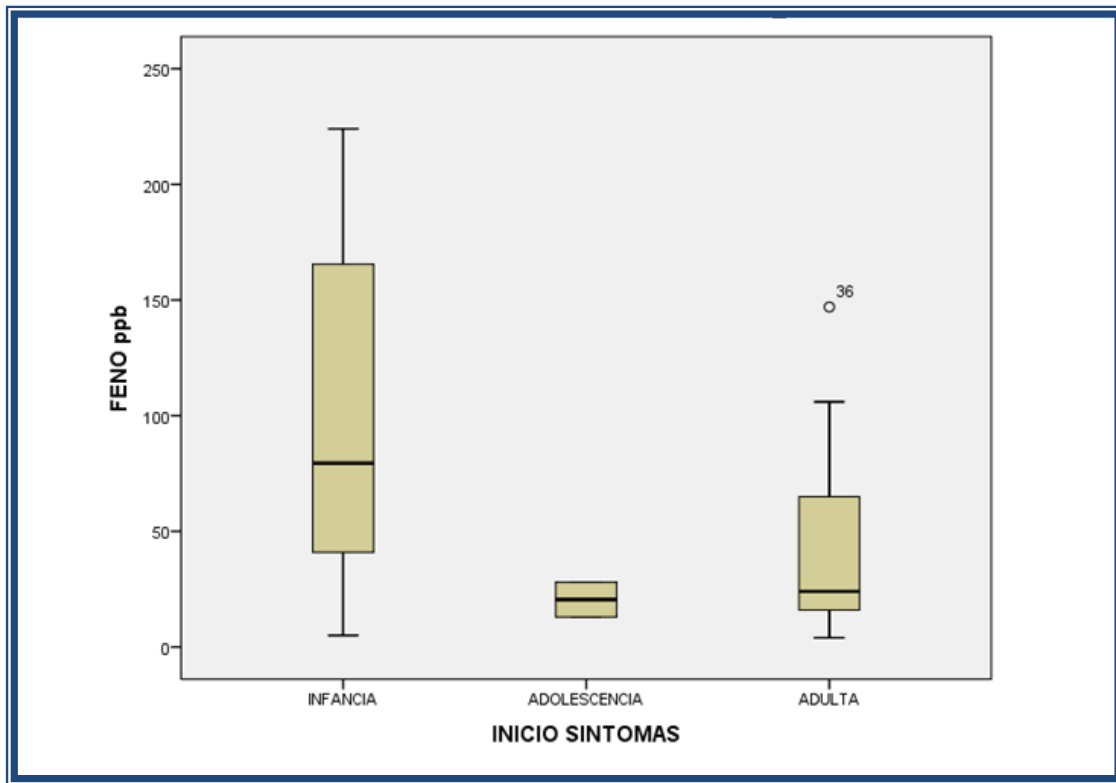


Figura 10B.



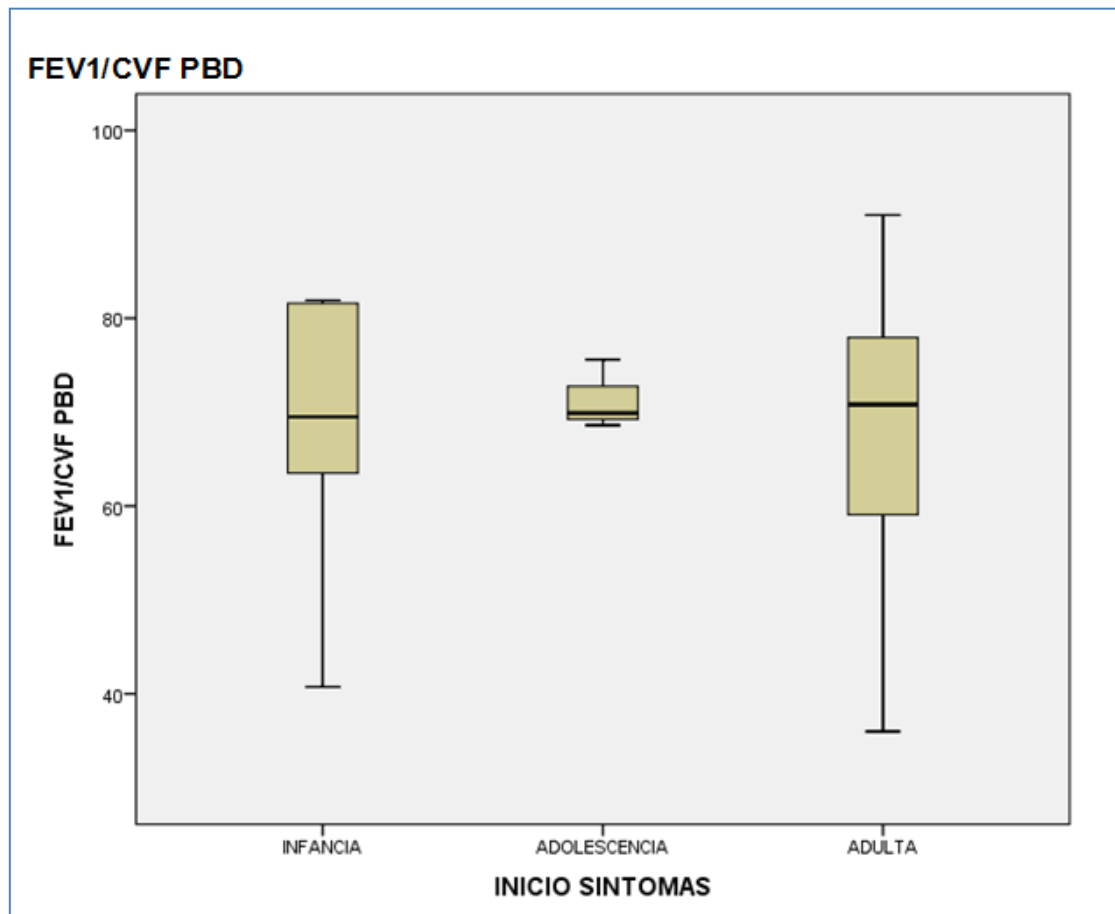
- Al contrario del IMC, y como era esperable, la FeNO resultó significativamente mayor en los asmáticos de inicio temprano comparados con los de inicio tardío (70 versus 24 ppb media), ($p < 0,05$), como se puede ver en la Figura 11. Si analizamos por separado, dentro del grupo de asma de inicio tardío (> 12 años), los asmáticos que debutaron en la adolescencia comparados con los que debutan en la edad adulta (> 18 años), observamos que el subgrupo de asma de inicio en la adolescencia se caracteriza en nuestro estudio por obesidad ($\text{IMC} > 30 \text{ kg/m}^2$) y FeNO significativamente más baja.

Figura 11. El asma de inicio temprano se correlaciona con una FeNO mayor.



- Subgrupos asma con limitación crónica al flujo aéreo versus obstrucción variable (PAFL vs NPAFL): no se encontraron diferencias significativas en cuanto a edad media, fenotipo Th2 alto / bajo, presencia o ausencia de atopia, tabaquismo, edad de inicio de los síntomas de asma (**Figura 12**), IMC y FeNO entre estos subgrupos.

Figura 12. La limitación crónica al flujo aéreo y la edad de inicio del asma.



FEV1/CVF PBD: índice FEV1/CVF post-broncodilatador.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos fenotipos de asma eosinofílica (eosinofílico puro y granulocítico mixto) para todas las variables comparadas, con excepción de los niveles de periostina, como se mencionará a continuación.

4.2. El papel de la periostina en esputo inducido como biomarcador de los distintos fenotipos de asma grave.

Las concentraciones de los niveles de periostina de esputo medidos en las muestras de nuestros pacientes están dentro del rango de 0.1-152 ng / ml, con una **media de 53.6ng/ml**, tal como se mostraba en la Tabla 4.

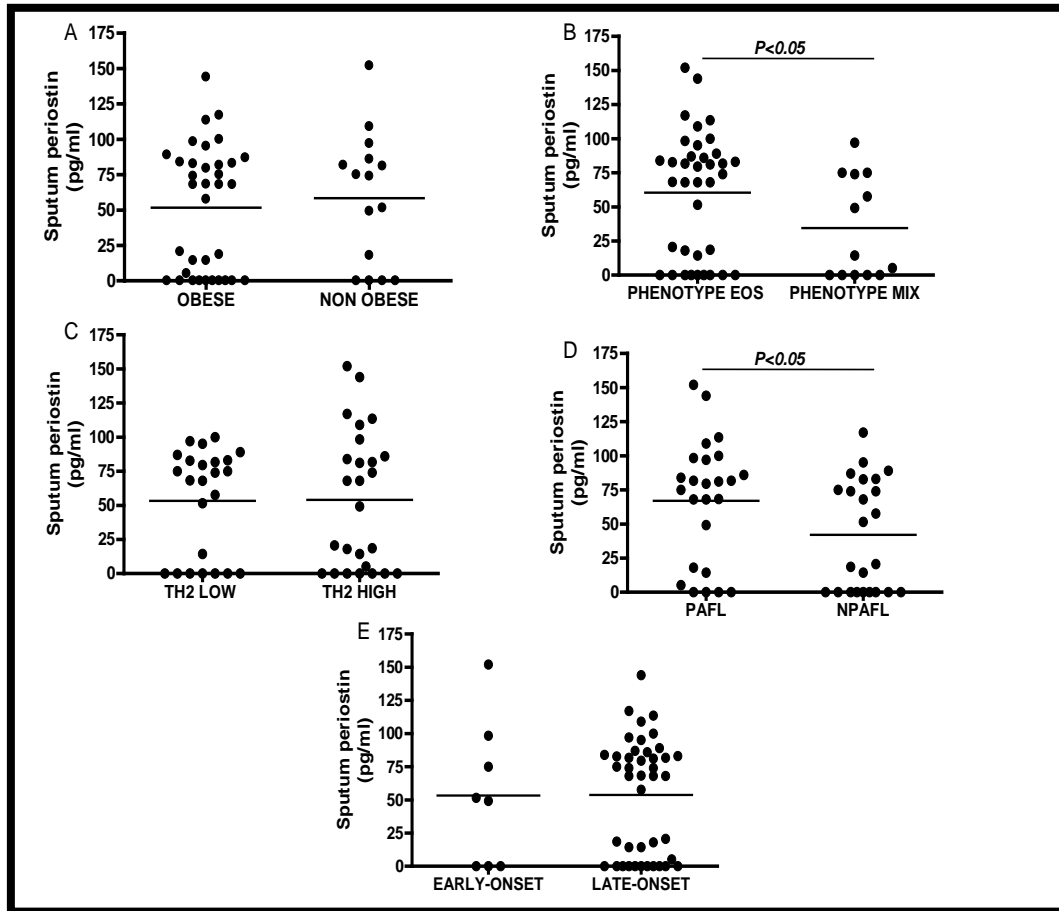
Con el fin de estudiar si la periostina en esputo podría ser un biomarcador de diferentes fenotipos de asma, se compararon los niveles de periostina entre los distintos fenotipos identificados: asma de inicio temprano versus tardío, asma y obesidad, T2 alto y bajo, eosinofílico puro versus mixto granulocítico y asma con o sin limitación crónica al flujo aéreo (véase también la **Figura 13**), con los siguientes resultados:

- Los niveles de periostina fueron similares en los no obesos en comparación con los asmáticos obesos, en el fenotipo Th2 alto en comparación con los pacientes Th2 bajos, y en el inicio temprano en comparación con el inicio tardío (Figura 11 A, C, E).
- Se encontró **una correlación positiva débil** (0,313, $p = 0,02$) entre los niveles de periostina y el porcentaje de eosinofilia en esputo en todos los pacientes del estudio, pero no entre los niveles de FeNO ppb y los niveles de periostina (0,064; $p = 0,667$).
- Como se puede observar en la figura 11B, los niveles de periostina fueron significativamente mayores en pacientes con **fenotipo eosinofílico puro** en comparación con aquellos pacientes con fenotipo inflamatorio granulocítico mixto (61,58 [3,1-152] versus 37,31 [0,1-97] ng/ml, $p < 0,05$).

Relación de la periostina con el proceso de remodelado de la vía aérea

Cuando se compararon los niveles de periostina entre los pacientes con eosinofilia persistente en el esputo a pesar del tratamiento con corticosteroides inhalados a dosis altas, se encontró que los niveles de periostina fueron significativamente mayores en pacientes con limitación crónica (n=25) en comparación con aquellos con limitación variable del flujo aéreo (n=25), los denominados en la Figura 13D PAFL frente a NPAFL: media [rango]) (69,76 [3,1-152] frente a 43,84 [0,1-117] ng / ml, p <0,05). También hubo una correlación inversa entre FEV1/FVC post-Broncodilatador y periostina (-0,276, p <0,05).

Figura 13. Niveles de periostina en esputo en los diferentes fenotipos de asma identificados.



Human periostin levels in induced sputum samples were measured by specific ELISA as described in Methods section. Individual data are shown. Statistical analysis was performed by Mann-Whitney U test. PAFL: persistent airflow limitation; PHENOTYPE EOS: eosinophilic phenotype; PHENOTYPE MIX: mixed granulocytic phenotype.

Tomada de (130): Irina Bobolea, Pilar Barranco, David Romero et al. Sputum periostin in patients with severe asthma and its relationship with asthma phenotypes. Allergy 2015.

4.3. Resultados en el subgrupo de pacientes con asma grave endotipo EREA:

4.3.1. La utilidad terapéutica (eficacia y seguridad) de la desensibilización a aspirina.

-Tras un proceso de inclusión muy riguroso, se llevaron a cabo 15 desensibilizaciones a aspirina en 14 pacientes (una paciente se desensibilizó en un segundo intento, detallado más abajo). Se siguió sin excepciones el protocolo detallado en el Anexo 1.

-La desensibilización fue un éxito en 13 de ellos, siendo una paciente con subfenotipo EREA muy grave imposible de desensibilizar: por descenso de hasta 44% del FEV1 con dosis de 50 mg de aspirina el primer día, la paciente precisó ingreso hospitalario durante 4 días, con reintentos de continuar la desensibilización todos los días: el día siguiente, tras comprobar la estabilización clínica y de la función pulmonar, se repetía la dosis previamente tolerada de 25 mg de aspirina, pero al intentar subir a 50 mg volvía a tener **broncoespasmo** severo (descenso >30% con respecto al basal), con lo cual el cuarto día se abandonó el proceso.

-Las 13 desensibilizaciones exitosas se realizaron en el Hospital de Día de Alergia, con monitorización continua de las constantes vitales y de la función pulmonar cada 3 horas y en caso de síntomas respiratorios, y previa canalización de una vía venosa periférica. Las reacciones experimentadas por los pacientes fueron leves-moderadas, consistiendo en síntomas naso-oculares- rinorrea acuosa, congestión nasal, estornudos, disnea sibilante con descenso del FEV1 entre un 6-17%, síntomas que cedieron con tratamiento sintomático, finalizándose la desensibilización con éxito al cuarto día, según protocolo. La dosis reactiva que desencadenó los síntomas fue la de 50 mg en 9/10 pacientes, uno reaccionó con 75 mg, y otro de los demás 9 reaccionó tanto con 50 como con 75 mg aspirina, tolerando luego sin problemas hasta 650 mg.

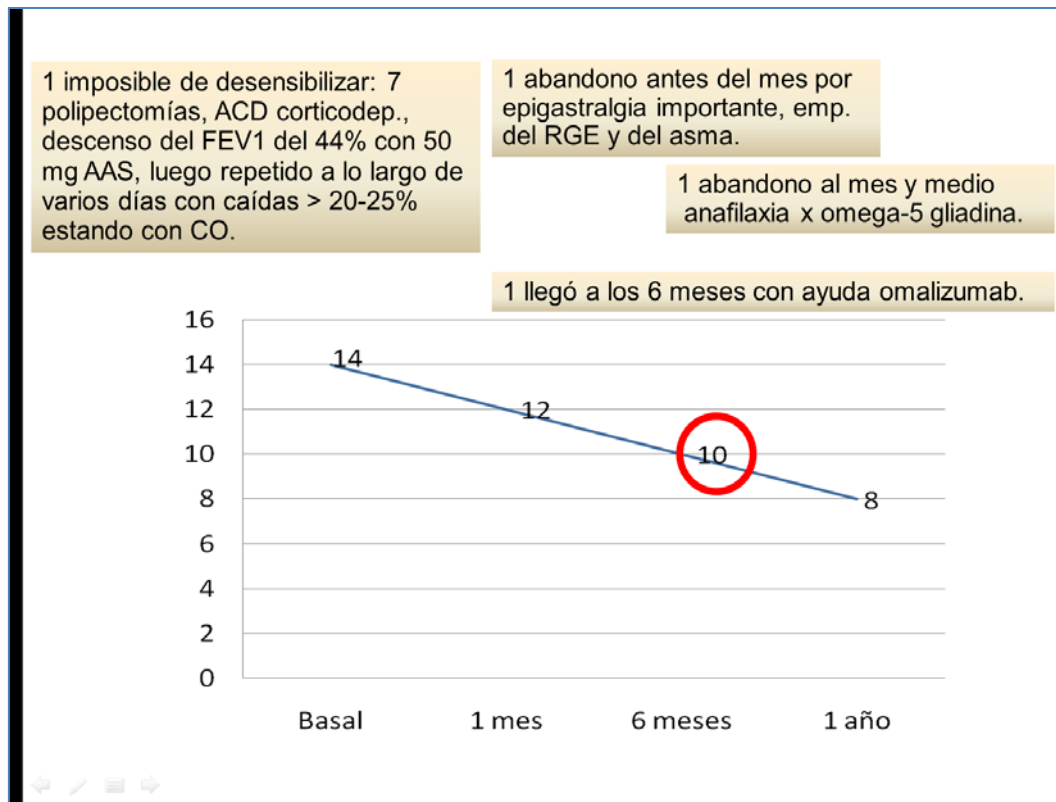
Fenotipos y endotipos de asma grave: mecanismos moleculares implicados en la patogénesis y en la desensibilización a aspirina

-De los 13 pacientes que se desensibilizaron con éxito, sólo 11 de ellos alcanzaron los 6 meses de tratamiento con aspirina: una paciente abandonó en el primer mes por dolor epigástrico incontrolable y reflujo ácido. El otro abandono se produjo en un paciente varón, después de un mes y medio de tomar aspirina sin problemas, por experimentar un shock anafiláctico: después de la cena, el paciente tomó 650 mg de aspirina, previamente tolerado durante 6 semanas, luego tomó una cerveza mientras veía un partido fútbol. La suma de todos estos cofactores desenmascaró una alergia desconocida a omega-5 gliadina, por lo que, además de recomendar una dieta sin gluten, la aspirina a largo plazo se suspendió considerando potenciales ingestas accidentales de gluten y el elevado riesgo de nuevas reacciones graves.

-De estos 11 pacientes que alcanzaron los 6 meses de desensibilización, una de ellos necesitó la adición de omalizumab para controlar la urticaria asociada inducida por aspirina que se desencadenó en el primer intento de desensibilización, de lo contrario incontrolable mientras tomaba aspirina diariamente. La segunda desensibilización se realizó con éxito a las 16 semanas de iniciar el omalizumab, pero fue excluida del presente estudio, ya que el omalizumab podría interferir con los biomarcadores evaluados (131).

- Así, analizamos finalmente 10 pacientes llegados a los 6 meses de desensibilización (ver Figura 14).

Figura 14. Resumen de las desensibilizaciones realizadas.



AAS, aspirina; ACD: asma de control difícil; CO: corticosteroides orales; RGE: reflujo gastro-esofágico.

- **Características de la muestra:** 6 mujeres, 4 varones, edad media 44 [21-65] años. 5 tenían asma leve - moderada pero pólipos nasales recurrentes severos, y los otros 5 pacientes tenían asma grave corticodependiente y rinosinusitis crónica con pólipos nasales. Polipeptomías: promedio 3/paciente (mínimo-máximo entre 1 y 7 polipeptomías por paciente). FEV1 inicial media: 68-98% del teórico.

- **Eficacia y seguridad:**

- Todos los pacientes toleraron sin reacciones adversas graves el procedimiento de la desensibilización seguido de toma de aspirina a diario, a dosis individualizadas en cada caso para mantener el control del asma, descendiendo a partir del primer mes progresivamente, y finalmente variando entre 325 mg de aspirina una vez al día hasta

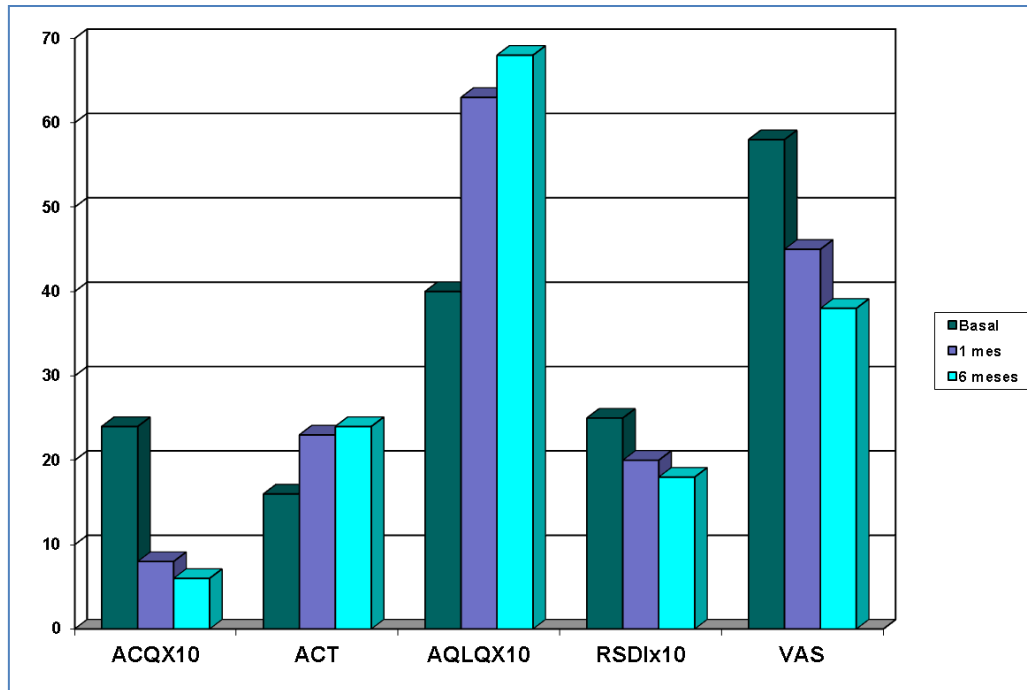
800 mg (500 y 300 mg cada 12 horas, respectivamente). Los únicos efectos adversos en 2 pacientes fueron dispepsia y epigastralgia que cedieron con antiácidos.

- Evolución de los parámetros clínicos analizados:

Todos los parámetros clínicos analizados mejoraron significativamente 1 y 6 meses después de la desensibilización (ver Figura 15 A). La desensibilización produjo una mejoría significativa de los síntomas inflamatorios de vías respiratorias tanto altas como bajas: mejoró el olfato, disminuyó el número de visitas a Urgencias por asma, aumentó el control y la calidad de vida para la rinitis y el asma, a partir de tan solo las 4 semanas de tratamiento, con la consiguiente reducción en los tratamientos de mantenimiento necesarios para controlar las enfermedades de base. En los pacientes con EREA y poliposis nasosinusal (todos los pacientes incluidos habían sufrido de promedio 3 polipsectomías, mínimo-máximo [1-7]) la desensibilización seguida de dosis diarias de aspirina, a largo plazo (hasta la fecha el primer paciente desensibilizado lleva más de 5 años con tratamiento crónico con aspirina) ha reducido la necesidad de cirugía y de corticosteroides tópicos y sistémicos. Hasta la fecha ninguno de estos pacientes ha tenido recidiva de pólipos nasales

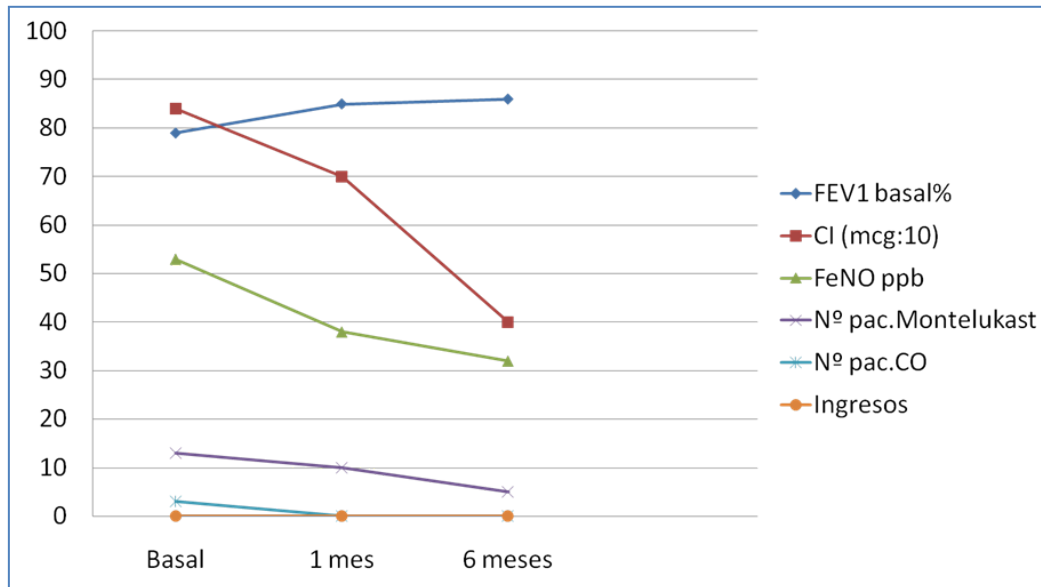
- Los parámetros espirométricos mejoraron ligeramente y los niveles de FeNO y eosinofilia en esputo disminuyeron en comparación con la situación basal (ns), a pesar de una reducción significativa en la dosis requerida de corticosteroides inhalados (dosis mediana inicial de fluticasona o equivalente inicial: 846 µg / día, 700 µg / día al mes, y a los 6 meses 400 µg / día, $p < 0,005$). Ver Figura 15 B.

Figura 15 A. Evolución de los parámetros clínicos analizados.



ACQx10: asthma control questionnaire multiplicado x10; ACT: asthma control test; AQLQ: asthma –related quality of life questionnaire x10; RSDI: cuestionario de calidad de vida relacionado con la rhinosinusitis x10; VAS: visual analogical scale para síntomas nasales.

Figura 15 B. Evolución de la función pulmonar, de la inflamación y de la necesidad de tratamiento.



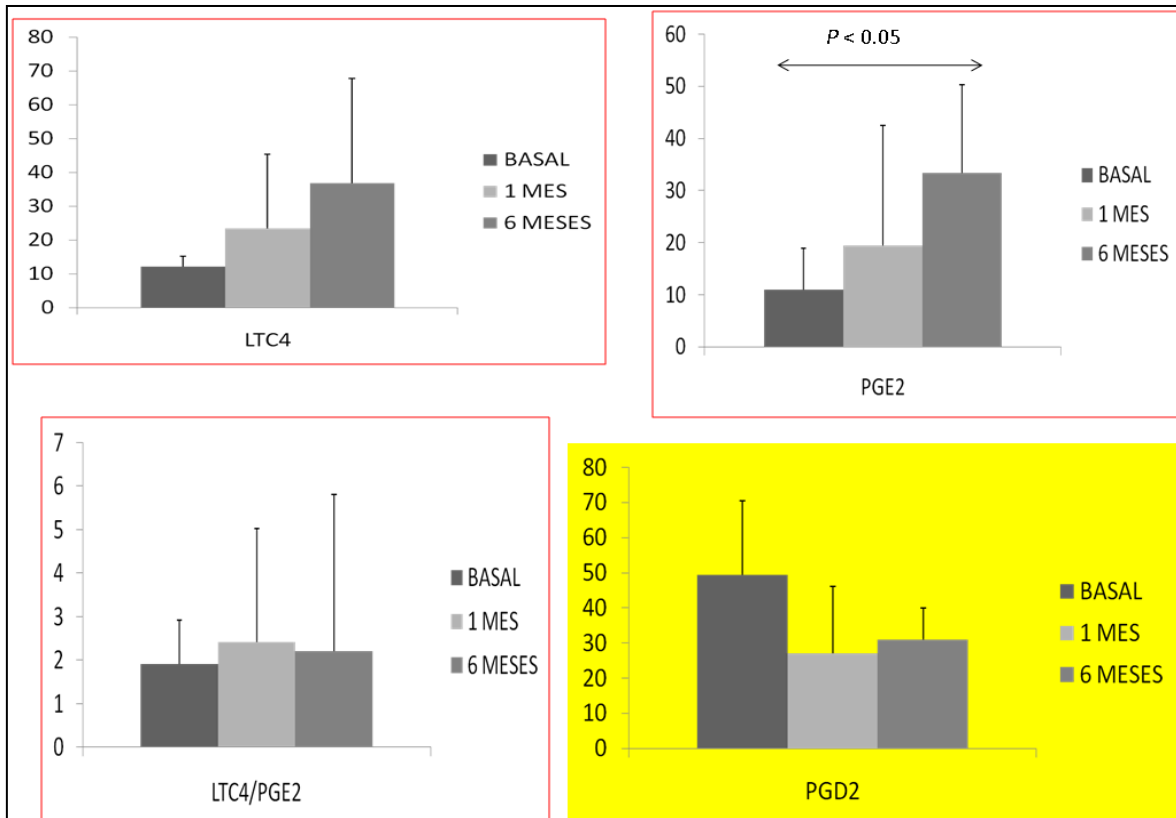
CI (mcg:10): dosis de corticoesteroides inhalados expresada en microgramos dividida por 10 por razones de escala; CO: corticoesteroides orales.

4.3.2. Análisis de biomarcadores en esputo inducido, pre y post- desensibilización a aspirina.

Eicosanoides.

La PGD2 (broncoconstrictora y proinflamatoria) disminuyó significativamente (media basal $49,21 \pm 21,27$; 1 mes $27,74 \pm 17,69$ - $p < 0,01$; 6 meses $30,90 \pm 9,16$ pg / ml, $p < 0,01$ con respecto a la basal). La PGE2 (broncoprotectora) aumentó al mes y a los 6 meses ($p < 0,05$) en comparación con el valor basal (media basal $10,93 \pm 8,03$; 1 mes $18,39 \pm 54,89$; 6 meses $30,90 \pm 9,16$ pg / ml). Pero la LTC4 también aumentó ligeramente (ns) (media basal $12,11 \pm 3,86$; 1 mes $18,55 \pm 20,98$; 6 meses $34,80 \pm 31,16$ pg / ml), manteniendo así un índice LTC4 / PGE2 constante antes y después de la desensibilización (ver Figura 16).

Figura 16. Cambios en los eicosanoides en esputo pre-post desensibilización.



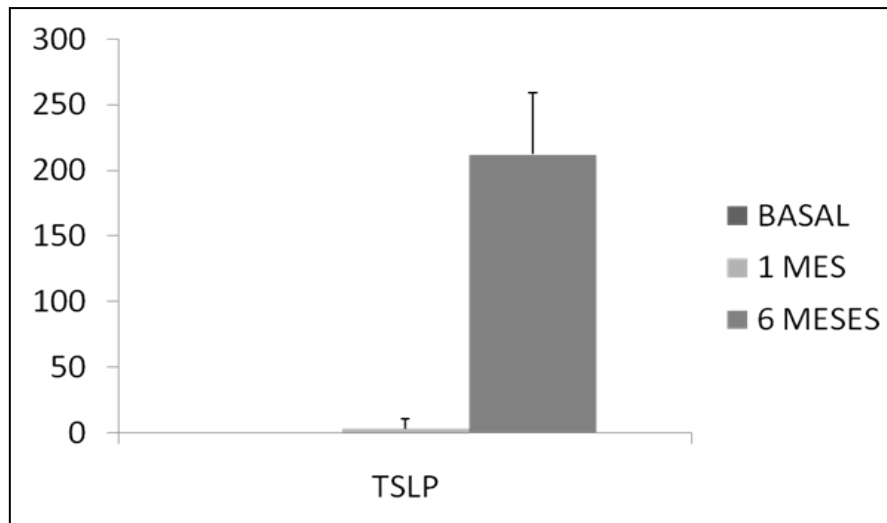
LTC4: leucotrieno C4; PGD2, E2: prostaglandina D2, E2.

Hemos demostrado, por lo tanto, que la desensibilización a aspirina produce varios cambios en el metabolismo del ácido araquidónico, defectuoso de entrada en los pacientes con EREA: la PGE2 (broncoprotectora) aumentó al mes y a los 6 meses ($p < 0,05$) en comparación con el valor basal, y la LTC4 (broncoconstrictora y proinflamatoria) disminuyó, pero de tal forma que el índice PGE2/LTC4 se mantuvo casi constante. La PGD2 (broncoconstrictora y proinflamatoria) disminuyó, lo que puede justificar la mejoría clínica de los pacientes sobre el fondo constante del índice PGE2/LTC4.

TSLP.

La TSLP aumentó en todos los pacientes (media basal $0,1 \pm 0,05$; 1 mes $3,68 \pm 7$; 6 meses $212,3 \pm 47$ pg / ml; $p < 0,01$) (Figura 17).

Figura 17. Aumento de la TSLP en esputo pre-post desensibilización.



La TSLP aumentó paradójicamente 6 meses después de la desensibilización, a pesar de la mejoría clínica y de la función pulmonar. Aunque nuestros hallazgos necesitan validación en estudios más amplios, postulamos que la TSLP puede actuar no sólo como una molécula efectora, sino también como reguladora.

Demostramos por primera vez la implicación de la TSLP en la patogénesis de la EREA y de la desensibilización a aspirina, lo que abre nuevos caminos para investigar tanto sobre sus funciones reguladoras aparte de las efectoras ya descritas hasta la fecha, como sobre su posible papel como diana terapéutica en pacientes con EREA, dado que hay en marcha varios ensayos clínicos con antagonistas TSLP.

5. DISCUSIÓN

Fenotipos de asma grave y el papel de la periostina

Hasta la década pasada, el tratamiento del asma se limitaba a varios medicamentos de mantenimiento que se usaban en todos los pacientes, independientemente de las diferencias en las características de la enfermedad. Con la presencia continua del asma grave refractaria a estas terapias y la emergencia de nuevas terapias biológicas, existe hoy un renovado interés en identificar fenotipos respondedores a las nuevas terapias. Aunque varios fenotipos y endotipos se han propuesto, existe aún mucho que se desconoce sobre la expresión génica, el efecto del ambiente y las comorbilidades, y el uso apropiado de los biomarcadores disponibles. La esperanza actual es que el mayor y mejor conocimiento de la heterogeneidad del asma permitirá seleccionar los nuevos tratamientos según la mayor probabilidad de respuesta terapéutica. En la actualidad estamos en una fase intermedia en el camino hacia la medicina personalizada en el asma, en la que se intenta caracterizar lo mejor posible a los pacientes asmáticos e identificar aquellas “características tratables”, *treatable traits*, y es este el enfoque del trabajo que ha dado lugar a la presente tesis. La distinción entre fenotipos basados en marcadores inflamatorios se ha mejorado mediante la introducción y el uso de técnicas no invasivas para medir la inflamación de las vías respiratorias, como esputo inducido, FeNO y condensado de aire exhalado, así como la identificación de algunos biomarcadores en sangre periférica y orina. El esputo inducido es una técnica reproducible, validada, relativamente simple y barata para la

evaluación de la inflamación de las vías respiratorias en el asma grave y resulta particularmente interesante ya que permite analizar tanto las células presentes en las vías aéreas como los innumerables mediadores en el sobrenadante, de una forma menos invasiva que la biopsia bronquial o el lavado broncoalveolar, pero más fiel a lo que sucede en el órgano diana, si la comparamos con mediadores de inflamación sistémica.

Al identificar el fenotipo inflamatorio de nuestros pacientes, encontramos que la mayoría de los pacientes con asma grave en nuestra serie tenían eosinofilia en el esputo, utilizando los puntos de corte para eosinófilos y neutrófilos utilizados en el SARP (*Severe Asthma Research Programme*). Este Programa de Investigación de Asma Grave (SARP) se puso en marcha en los EE.UU. en un intento de identificar y caracterizar un gran número de pacientes que cumplen con los criterios de gravedad de la ATS (139, 140). Un subanálisis del SARP centrado en 175 pacientes con asma grave (44) buscó diferencias clínicas y fisiopatológicas entre los pacientes fenotipados de acuerdo con la celularidad del esputo inducido como un marcador de la inflamación subyacente. Se ha demostrado que tanto la presencia en el esputo de $> 2\%$ de eosinófilos, como $> 40\%$ de neutrófilos, relacionada con la función pulmonar más pobre, el aumento de la morbilidad y las exacerbaciones. El "fenotipo eosinofílico", en comparación con el "fenotipo neutrofílico", presentó valores más altos de FeNO, más eosinofilia periférica y mayor necesidad de medicación de rescate. Los pacientes que cumplieron ambas características inflamatorias fueron los más graves. Como nuestra población de estudio se parecía más al subgrupo SARP, elegimos estos puntos de corte para la eosinofilia y la neutrofilia de esputo, respectivamente, cuando se fenotiparon a los pacientes. Por lo tanto, mediante el análisis del recuento diferencial de células de esputo, se encontró que el 96% de los pacientes con asma grave tenían eosinofilia en las vías respiratorias ($> 2\%$) a pesar de recibir tratamiento con corticosteroides inhalados en

dosificación alta, porcentaje más alto que en otras series (23, 36). Esta casi ausencia del fenotipo neutrofílico "puro" podría explicarse por un lado por el alto porcentaje de atopía, del perfil Th2-alto y la presencia de poliposis / hipersensibilidad a la aspirina en nuestra población estudiada y, por otra parte, por haber sido rigurosamente excluidos los grandes fumadores (IPA>10), los pacientes diagnosticados de EPOC, y los pacientes con deterioro severo de la función pulmonar, entre los cuales se podría haber esperado más prevalencia del fenotipo neutrofílico.

Mirando más en profundidad, Wenzel et al publicaron luego un artículo (38) que adopta un nuevo enfoque de los fenotipos del asma, evolucionando desde el enfoque clínico hasta los mecanismos moleculares. Independientemente de todos los estudios fenotípicos publicados, parece que la edad de inicio fue un factor de suma importancia. El inicio temprano es consistentemente asociado con una condición alérgica en todos los rangos de gravedad. El inicio tardío suele ser menos alérgico y se asocia con inflamación eosinofílica persistente, obesidad y sexo femenino, como también se encontró en nuestro estudio (80% de nuestros pacientes eran mujeres, 60% obesos, 62% no alérgicos). El asma de inicio tardío se correlacionó en nuestro estudio con un IMC mayor, mientras que la FeNO resultó significativamente mayor en los asmáticos de inicio temprano comparados con los de inicio tardío, datos concordantes con los previamente publicados.

A continuación, nos centramos en aquellos pacientes con asma eosinofílica, ya que los nuevos tratamientos biológicos se dirigen a este subgrupo. En nuestro estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos fenotipos de asma eosinofílica descritos (eosinofílico puro y granulocítico mixto) para todas las variables comparadas, con excepción de los niveles de periostina, tal como se discute a continuación.

La creciente evidencia en el momento de realización de este estudio apoyaba la aparición de la **periostina** como biomarcador emergente para la inflamación Th2 de las vías respiratorias (2598-100). La periostina, secretada por las células epiteliales de las vías respiratorias en respuesta a la estimulación por IL-4 e IL-13, fue identificada originalmente por el perfil genómico en biopsias bronquiales de pacientes asmáticos y parecía prometedora para predecir respuestas a terapias biológicas dirigidas a dianas Th2 (94). Sin embargo, a pesar de estos avances, el uso de periostina sola o en combinación con otros biomarcadores necesitaba estudios adicionales para delimitar mejor su utilidad en la caracterización de pacientes asmáticos por fenotipo y la predicción de su respuesta a los tratamientos nuevos o ya existentes.

El estudio publicado por Jia et al (25) demostró que la periostina sérica era un buen predictor de la inflamación eosinofílica de las vías respiratorias. Los niveles medios de periostina fueron significativamente más altos en los sujetos con "eosinófilos altos" en comparación con los sujetos "bajos en eosinófilos", como se define en las mediciones de eosinófilos de esputo o biopsias bronquiales. En un modelo de regresión logística, la periostina sérica > 25 ng/ml fue el mejor predictor de esputo y eosinofilia tisular, mostrando superioridad a los eosinófilos sanguíneos, IgE y FeNO. Con lo cual la tendencia inmediata de los investigadores clínicos en asma ha sido, a partir de la publicación de este trabajo, utilizar la periostina sérica como sustituto de la eosinofilia en esputo inducido, dado que para la realización del esputo se requiere tiempo y personal entrenado, lo que limita su uso en la práctica clínica habitual. Sin embargo, nuestro estudio aportó datos nuevos que cambiaron esta perspectiva. Posteriormente, nuestros datos fueron confirmados por otros trabajos.

En nuestro estudio, la periostina en esputo se correlacionó muy débilmente con la eosinofilia en esputo en todos los pacientes del estudio (correlación positiva débil

[0,313, $p = 0,02$]). Con lo cual interpretamos con cierta precaución que la periostina sérica, más lejana aún del foco inflamatorio, fuese tan exacta a la hora de predecir eosinofilia en esputo, lo que posteriormente se demostró en un estudio más amplio (26): en 2014 el grupo de Peter Sterk en Amsterdam se planteó cuantificar la relación entre la eosinofilia periférica, FeNO y periostina sérica con eosinofilia en el esputo, utilizando dos cohortes de pacientes independientes, una de 110 pacientes con asma moderada-grave, y otra cohorte de replicación de 37 pacientes con asma moderada-grave, siendo ambas cohortes valoradas en un momento determinado (estudio transversal). Se indujo el esputo para medir eosinófilos ($> 3\%$ punto de corte), y en paralelo se cuantificaron eosinofilia y periostina séricas y la FeNO. Encontraron que la eosinofilia periférica, seguida del FeNO, son más útiles para predecir la inflamación eosinofílica en la vía aérea que la periostina (AUC para periostina: 0.55, comparada con 0.89 y 0.78 para eosinofilia periférica y FeNO, respectivamente).

Es más, en nuestro estudio no se encontró correlación entre los niveles de FeNO y periostina en esputo ($r = 0,064$, $p = 0,667$), pero los niveles de periostina fueron significativamente mayores en los pacientes con eosinofilia en comparación con aquellos con fenotipo inflamatorio granulocítico mixto, lo que sugiere que múltiples factores pueden afectar y determinar las concentraciones de periostina del esputo. A pesar de que algunos estudios han evidenciado cierta asociación con la inflamación eosinofílica (eosinófilos en el esputo, eosinofilia, eosinófilos en biopsias o lavado broncoalveolar), no había una clara relación entre el FeNO y la eosinofilia en el esputo. Hoy ya hay bastante evidencia para poder afirmar que ni la FeNO, ni la periostina de forma aislada pueden predecir la eosinofilia en la vía aérea. La tendencia actual es dejar de buscar aquel “biomarcador ideal” capaz de identificar por sí solo los distintos fenotipos de asma, sino mejor utilizar un panel de biomarcadores, por ejemplo la

periostina en combinación con otros biomarcadores más convencionales, tales como eosinófilos de sangre y esputo, FeNO e IgE sérica, para refinar mejor los pacientes asmáticos de forma individual.

En cambio, la periostina parece que tiene valor a la hora de predecir otra característica fundamental del asma grave. Como ya se había sugerido por otros autores (18, 97, 134), la periostina parece estar asociada con el remodelado de la vía aérea, especialmente con la fibrosis subepitelial y con la disminución progresiva del FEV1. En nuestro estudio, los altos niveles de periostina de esputo se correlacionaron de forma muy significativa con la limitación crónica al flujo aéreo, hallazgo encontrado en otros estudios, pero midiendo periostina sérica; lo que sugiere, sin embargo, un papel importante que pueda tener la periostina, especialmente en dinámica en el mismo paciente, a la hora de predecir la pérdida acelerada de función pulmonar.

Parece razonable que las diferencias en la remodelación de las vías respiratorias puedan proporcionar una alternativa o, más probablemente, un mecanismo adicional responsable de la actividad de la enfermedad en la población de pacientes con asma grave. Pepe et al. (135), por ejemplo, consideran que la alteración del músculo liso es el cambio estructural clave que distingue el asma grave del moderado, lo que contribuye a la dificultad para obtener un control adecuado en estos sujetos. Hay ya algunos estudios que demuestran la eficacia de nuevos tratamientos antiasmáticos a la hora de disminuir el grosor de la pared bronquial, con lo cual la periostina elevada podría ser un marcador de respuesta a las terapias dirigidas a reducir el remodelado.

Nuestro estudio tiene varias limitaciones, en primer lugar el tamaño pequeño de la muestra comparado con los estudios publicados previamente (44, 94). A cambio, nuestro trabajo describe “la vida real” de los pacientes con asma grave, manejados de

acuerdo con las actuales guías, en oposición a las condiciones rigurosamente controladas de los ensayos clínicos. Por ello no hemos excluido a los pacientes fumadores, lo que se podría considerar una limitación, aunque el límite de 10 paquetes/año en nuestro estudio es bastante bajo a la hora de sospechar una influencia importante del tabaquismo en el remodelado bronquial y en los datos de función pulmonar. Nuestros resultados son similares a los reportados por otros autores, quienes también encuentran que el aumento de la inflamación de las vías respiratorias Th2 se caracteriza por una obstrucción más severa del flujo aéreo (134). Nuestra muestra incluye un porcentaje de fumadores del 17%. Se ha demostrado en otro estudio que el tabaquismo puede disminuir los niveles de periostina sérica, sin embargo en otros estudios no, y tampoco hay datos sobre periostina en esputo. Las correlaciones con los otros biomarcadores T2- FeNO, eosinofilia en esputo-consideramos que no se ven alteradas por el hábito tabáquico en cualquier caso, ya que también hay estudios que demuestran disminución de la FeNO y de la eosinofilia en fumadores, por lo cual asumimos una probable influencia global del tabaco sobre todos estos parámetros analizados pero manteniendo las correlaciones encontradas. Por último, se puede especular que la afectación de la función pulmonar se podría deber al tabaco aparte de la inflamación asmática per se, aunque el límite de <10 paquetes/año es considerado bajo, y no hubo diferencias significativas en cuanto al hábito tabáquico entre los subgrupos asma con limitación crónica al flujo aéreo versus obstrucción variable (PAFL vs NPAFL).

Una mención sobre los valores de periostina obtenidos en este estudio, comparados con los publicados por otros autores: los valores absolutos se deben de interpretar con cierta precaución, y teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

Primero, no hay otros datos sobre niveles de periostina en sobrenadante de esputo, para poder comparar nuestros valores. Los datos publicados hasta la fecha son

sobre niveles de periostina en suero, y tampoco son concluyentes, ya que para la medición de periostina se emplearon técnicas diferentes. En el estudio BOBCAT (25) se utilizó un kit de ELISA home-made fabricado con la ayuda de la casa comercial Genentech, estableciendo un punto de corte de 25 ng/ml. Un grupo japonés que utilizó el mismo kit de ELISA comercial que nosotros empleamos en este estudio (R&D Systems) reporta los siguientes valores: el promedio de periostina sérica fue de 39,1 ng/mL en el estudio de Matsumoto et al (95), que incluyó 66 sujetos sanos (edad promedio: 60,7 años y 40 hombres). Otros estudios Japoneses que emplean el mismo kit de ELISA muestran valores de periostina sérica en controles y asmáticos que se superponen, con una periostina sérica media entre 25-36 ng/mL (96, 97). El grupo de Estudio de periostina de Nueva Zelanda, quienes utilizan otro kit comercial disponible para la medición de periostina, (Elecsys® Periostin immunoassay, Roche Diagnostics, Penzberg, Germany), reportan que la periostina sérica media encontrada en sujetos sanos fue de 50,1 ng/mL (136), similar a la que previamente habían reportado- 53,7ng/mL- en un población con diagnóstico de asma. Este kit de ELISA es teóricamente similar al empleado en nuestro estudio, pero no idéntico, siendo esto una de las razones de las diferencias en los valores de periostina sérica encontrados entre los estudios japoneses y neozelandeses, los más amplios hasta la fecha, ya que no encuentran correlación de periostina con la raza.

Dos ideas principales a tener en cuenta: uno, el que no debemos comparar niveles/valores de periostina que se hayan determinado por ensayos que emplean diferentes anticuerpos, que puedan presentar diferentes o desconocida afinidad por las múltiples isoformas de la periostina descritas hasta el momento. Y segundo: estos hallazgos recientes no descartan la utilidad de la periostina sérica como biomarcador en la guía del manejo personalizado del asma. La periostina sola no sirve para predecir

eosinofilia en esputo, ni parece que discrimine con un punto de corte claro sujetos sanos de pacientes asmáticos.

Sin embargo, como biomarcador de remodelado y predictor de la pérdida acelerada de función pulmonar, consideramos que la periostina puede jugar un papel relevante. Esto sólo significa que de momento, al igual que ha ocurrido con otros biomarcadores como el FeNO, los clínicos, somos quienes debemos aprender a interpretar los valores de periostina en el contexto individual de las características de cada paciente, y su dinámica en el tiempo en el seguimiento de las nuevas terapias anti-T2.

En resumen, el porcentaje de asma eosinofílica en nuestros pacientes con asma grave es mayor que en otras series, probablemente debido a los estrictos criterios de inclusión y exclusión ya las características de la muestra. Este es el primer estudio que demuestra la asociación entre los niveles de periostina del esputo y la limitación persistente del flujo aéreo en pacientes con asma grave y eosinofilia persistente de esputo a pesar del tratamiento con corticosteroides inhalados en dosis altas. La periostina en esputo se correlacionó sólo débilmente con la eosinofilia en esputo. Por lo tanto, y a la luz de nuevos estudios, concluimos que la periostina no es útil como sustituto de la eosinofilia en esputo, sino para su correlación con el proceso de la remodelación de la vía aérea, siendo ésta la aproximación pronóstica y terapéutica más adecuada.

Eficacia, seguridad y mecanismos moleculares de la desensibilización a aspirina

Utilidad práctica de los resultados obtenidos: los pacientes incluidos en este estudio se beneficiaron de un diagnóstico y un tratamiento rápidos y eficaces, teniendo en cuenta que la EREA es una enfermedad grave y potencialmente mortal en caso de

administración accidental de algún AINE en pacientes no diagnosticados.

De hecho, a raíz de este estudio se desarrolló y se puso en marcha en el Hospital La Paz una Vía clínica interdisciplinar, para el posterior beneficio de todos los pacientes con esta patología atendidos en este centro.

Todos los pacientes toleraron sin reacciones adversas graves el procedimiento de la desensibilización seguido de toma de aspirina a diario, a dosis individualizadas en cada caso para mantener el control del asma, descendiendo a partir del primer mes progresivamente. Todos los parámetros clínicos y de función pulmonar analizados mejoraron significativamente 1 y 6 meses después de la desensibilización. La desensibilización produjo una mejoría significativa de los síntomas inflamatorios de vías respiratorias tanto altas como bajas: mejoró el olfato, disminuyó el número de visitas a Urgencias por asma, aumentó el control y la calidad de vida para la rinitis y el asma, a partir de tan solo las 4 semanas de tratamiento, con la consiguiente reducción en los tratamientos de mantenimiento necesarios para controlar las enfermedades de base, igual que se había reportado en estudios más amplios.

En cuanto a los mecanismos moleculares subyacentes: recordemos que el patrón inflamatorio eosinofílico y las alteraciones en la ruta metabólica de degradación del ácido araquidónico son los elementos clave que nos ayudan a explicar la expresión clínica de la EREA. Las citoquinas proinflamatorias sintetizadas por los linfocitos Th2 activados y las células epiteliales (IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 y GM-CSF), que se encuentran elevadas, tienen un papel fundamental en el reclutamiento tisular de los eosinófilos e incrementan *in vitro* la vida media de estas células, inhibiendo la apoptosis (11). Se había observado en estudios anteriores que la desensibilización crónica disminuye la síntesis de LTB₄ por parte de los monocitos periféricos al nivel de los controles normales. También disminuye la síntesis de los cisteinil-LT, objetivada

por la disminución de los niveles urinarios de LTE₄, pero sin alcanzar los niveles de los sujetos sanos. Dadas las numerosas actividades antiinflamatorias del AAS, no se puede descartar que la administración de dosis altas de este fármaco ejerza efectos clínicamente beneficiosos independientes del fenómeno de la desensibilización. El AAS es capaz de inhibir la síntesis o activación de algunos factores de transcripción como el NF-κB y el STAT6, que modulan las respuestas inflamatorias de las vías aéreas. El STAT6 regula, entre otras, la síntesis de algunas citocinas implicadas en el asma como la IL-4 y la IL-13, y la disminución de las cuales podría tener un efecto antiinflamatorio (123), lo que se ha confirmado en un estudio reciente (122). Los AINE (aspirina e indometacina) inhibieron la STAT-6 en los linfocitos T CD4. Esta inhibición fue significativamente mayor en los pacientes sensibles a la aspirina (n=11) que en los sujetos tolerantes a la aspirina (n=10), y se asoció con una reducción de la expresión de la IL-4. Estos hallazgos tienen implicaciones para los beneficios clínicos de la desensibilización de la aspirina en pacientes sensibles a la aspirina con asma (122).

En un estudio publicado previamente por el mismo grupo de Katial et al en 2010 (123), ya se había demostrado que la desensibilización a largo plazo (6 meses) inducía supresión de la IL-4 (citoquina responsable de la expresión de los receptores de cis-LT en linfocitos T y B), y también de la MMP-9, enzima proinflamatoria que se relaciona con el reclutamiento de células inflamatorias (neutrófilos y eosinófilos) en la vía aérea.

En nuestro estudio, la eosinofilia en esputo y la FeNO disminuyeron de forma significativa al mes y a los 6 meses de tratamiento, a pesar de la disminución de la dosis requerida de corticosteroides inhalados, lo que se puede deber a la disminución de las citocinas arriba mencionadas, y a la disminución de LTC₄ en esputo observada.

El cambio global demostrado en los metabolitos del ácido araquidónico medidos pre y post-desensibilización en el esputo inducido se correlaciona con la mejoría clínica

experimentada por los pacientes (el descenso de PGD2 broncoconstrictora y proinflamatoria sobre un fondo constante de LTC4/PGE2), lo que es concordante con resultados obtenidos en otros estudios.

En cuanto a la TSLP, ya que su papel parecía más bien efector y proinflamatorio, y teniendo en cuenta la mejoría clínica de los pacientes, lo esperable era de que también disminuyera con la desensibilización a largo plazo. El sorprendente resultado del aumento significativo de la TSLP al mes y a los 6 meses se puede explicar por lo siguiente: nuestra primera hipótesis fue que la TSLP puede actuar no sólo como una molécula efectora, sino también como un regulador, lo que implicaría efectos pleiotrópicos de la TSLP en diferentes endotipos de asma. (118). Otro factor a tener en cuenta es que desconocemos los efectos de la aspirina a largo plazo sobre los niveles de TSLP en asmáticos tolerantes, ya que en nuestro estudio no hubo un grupo control, ni hay datos publicados al respecto, con lo cual podría ser un efecto relacionado a la inhibición de la COX-1 que desconocemos hasta la fecha. Sin embargo, datos recientes apuntan a que lo más plausible es que el aumento de la TSLP se haya producido por un mecanismo de feed-back negativo, que puede que sea específico de la EREA: como se ha mencionado, la TSLP se ha demostrado que controla directamente la generación de PGD2 en pacientes con EREA (137). Con lo cual una de las funciones de la TSLP disregulada en pacientes con EREA sabemos que es mantener niveles elevados de PGD2. La desensibilización a largo plazo, en nuestro estudio y en otros (117) disminuyó significativamente la producción de PGD2, con lo cual el aumento de la TSLP puede ser simplemente compensatorio a este descenso.

Este hallazgo podría tener implicaciones terapéuticas importantes, ya que la PGD2 es relevante en todos los pacientes con EREA, por lo tanto bloquearla implica una mejoría clínica, tal como se ha demostrado con la desensibilización. Además, varios

antagonistas de receptores de la PGD2 (CRTH2) están actualmente en ensayos clínicos, con resultados muy prometedores, lo que apoya el efecto crucial de la inhibición de la PGD2 sobre la mejoría clínica. Esto es aún más relevante si recordamos que la PGD2 es dramáticamente elevada en aquellos subfenotipos más graves de EREA. Incluso se ha demostrado que los pocos pacientes que resultan imposible de desensibilizar tienen niveles de PGD2 mucho más elevados que pacientes con EREA menos graves (138). En resumen, podemos postular que bloquear la TSLP interrumpiría directamente la generación de la PGD2, lo que se traduciría en un mejor pronóstico de los pacientes con EREA, particularmente los más graves.

Bloquear la TSLP ya es posible, dado que varios antagonistas de la TSLP están actualmente en ensayos clínicos fase II en pacientes con asma alérgica, con buenos resultados en cuanto eficacia y seguridad hasta la fecha.

Demostramos en nuestro estudio piloto un papel importante que la TSLP parece jugar en la patogénesis de la EREA. Nuestros resultados deberían ser confirmados en estudios más amplios, sin embargo, una prometedora aplicabilidad de esa tesis es que los agentes biológicos anti-TSLP podrían constituir una futura opción terapéutica para los pacientes con EREA.

6. CONCLUSIONES

1. El fenotipo asma eosinofílica en nuestra serie de pacientes con asma grave es más prevalente que en otras series, probablemente debido a los estrictos criterios de inclusión y exclusión y a las características de la muestra.
2. Este es el primer estudio que demuestra la asociación entre los niveles de periostina en esputo y la limitación persistente del flujo aéreo, en pacientes con asma grave y eosinofilia persistente en esputo a pesar del tratamiento con corticosteroides inhalados en dosis altas.
3. La periostina se correlaciona con la obstrucción al flujo aéreo y por tanto, de forma indirecta, con el proceso de remodelación de la vía aérea, lo que puede ser útil como aproximación pronóstica y terapéutica.
4. La desensibilización a aspirina resultó ser un procedimiento seguro y eficaz en los pacientes correctamente seleccionados.
5. El cambio global demostrado en los metabolitos del ácido araquidónico post-desensibilización se correlaciona con la mejoría clínica experimentada por los pacientes (el descenso de PGD₂ sobre un fondo constante de LTC₄/PGE₂).
6. La TSLP aumentó paradójicamente 6 meses después de la desensibilización a aspirina, a pesar de la mejoría clínica y de la función pulmonar, lo que implica que la TSLP puede actuar no sólo como una molécula efectora, sino también como reguladora.

7. Demostramos por primera vez la implicación de la TSLP en la patogénesis de la EREA y de la desensibilización a aspirina, lo que abre nuevos caminos para investigar tanto sobre sus funciones reguladoras, como sobre su papel como diana terapéutica en pacientes con EREA, dado que varios ensayos clínicos con antagonistas TSLP están en curso actualmente.

8. Estos resultados suponen una mejora en el conocimiento de los mecanismos patológicos del asma grave, abriendo posibles vías de aproximación pronóstica y terapéutica en el camino hacia la medicina personalizada en el asma.

7. PUBLICACIONES Y PREMIOS DERIVADOS DE ESTA TESIS, POR ORDEN CRONOLÓGICO:

PUBLICACIONES EN REVISTAS

1. **I Bobolea**, P Barranco, S Quirce. Protocolo diagnóstico del asma inducido por la toma de aspirina en pacientes con sospecha de enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina. Espacio asma 2009; 2(1): 12. E.
2. **I Bobolea**, P Barranco, A Fiandor, R Cabañas, S Quirce. Omalizumab: A possible new therapeutic approach for aspirin-exacerbated respiratory disease. J Invest Allergol Immunol Clin 2010; 20(5):448-9. A. FI: 1.489.
3. **I Bobolea**. Desensibilización con aspirina en el asma. Espacio asma 2012; 5(3):88-90.
4. **I Bobolea**, S Quirce. Manejo interdisciplinario de la poliposis nasosinusal en la enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina. Rev Rinol 2012; 12 (1):40-53.
5. **Bobolea I**, Cabañas R, Jurado J, Fiandor A, Quirce S. Concurrent coxibs and antiplatelet therapy unmasks aspirin-exacerbated respiratory disease. Eur Resp Journal 2013; 42(5): 1418-38.
6. D. Guillen, **I Bobolea**, Oscar Calderon, Ana Fiandor, R Cabañas, Rocío Heredia, Santiago Quirce. Aspirin desensitization in a patient with aspirin exacerbated urticaria and respiratory disease, achieved after treatment with omalizumab. J Investig Allergol Clin Immunol 2015; Vol. 25(2): 133-162
7. **Irina Bobolea**, Pilar Barranco, David Romero M Victoria del Pozo, Verónica Sanz,

Julio Canabal, Valentín López-Carrasco, Carlos Villasante, Santiago Quirce. Sputum periostin in patients with severe asthma and its relationship with asthma phenotypes. *Allergy* 2015; 70(5):540-6.

8. Kimura H, Suzuki M, Konno S, Nishimura M, **Bobolea I**, Barranco P, Del Pozo V, Romero D, Sanz V, López-Carrasco V, Canabal J, Villasante C, Quirce S. Sputum periostin in patients with different severe asthma phenotypes. *Allergy* 2015; 70(7):884-5. A. FI: 6.335. Q1, D1.

9. Rijo Y, Canabal J, Fiandor A, **Bobolea I**, Quirce S, Cabañas R. Aspirin Desensitization in a Patient With NSAID-Induced Delayed Angioedema. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2015; Vol. 25(2): 133-162.

10. **Irina Bobolea**, Victoria del Pozo, Veronica Sanz, Rosario Cabañas, Ana Fiandor, Carolina Alfonso-Carrillo, MaAngeles Salcedo, Valentin López Carrasco, Rocío Heredia Revuelto, Santiago Quirce. Aspirin desensitization in aspirin-exacerbated respiratory disease: some new insights into the molecular mechanisms. Currently under revision in *Ann ofAllergy*.

CAPITULOS DE LIBRO

11. I Bobolea, J Quiralte. Enfermedad respiratoria exacerbada por antiinflamatorios no esteroideos. En: *Asma Grave*. P Barranco, S Quirce Eds. Luzan 5 S.A. 2013: ISBN 978-84-7989-759-8: 131-50.

12. S. Quirce, **I Bobolea**. Nuevos tratamientos farmacológicos. En: *Asma Grave*. P Barranco, S Quirce Eds. Luzan 5 S.A. 2013: ISBN 978-84-7989-759-8: 237-54.

13. J Dominguez, I Bobolea, S Quirce. Síndrome de Fernand Vidal (ASA-triada). En: 100 síndromes en Alergia e Inmunología clínica (Fascículo 2). R. Pelta Fernandez Ed. INYECCION SLU 2013: ISBN 978-84-695-9275-5: 24-26.

14. Irina Diana Bobolea, Carlos Melero and Jesús Jurado-Palomo (2016). Current and Future Asthma Treatments: Phenotypical Approach on the Path to Personalized Medicine in Asthma. En: Asthma - From Childhood Asthma to ACOS Phenotypes, Prof. Celso Pereira (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/62411. Available from: <http://www.intechopen.com/books/asthma-from-childhood-asthma-to-acos-phenotypes/current-and-future-asthma-treatments-phenotypical-approach-on-the-path-to-personalized-medicine-in-asthma>.

PREMIOS:

- Premio para **el mejor caso clínico** (como adjunta supervisora) en la sección “Alergia a medicamentos”, concurso Schering-MSD-SEAIC de Casos clínicos para residentes de Alergología 2012. Guillen D, Bobolea I, Cabañas R, Rivero D, Quirce S. Desensibilización con aspirina en paciente con enfermedad respiratoria y urticaria exacerbadas por AINE, alcanzada tras el tratamiento con omalizumab. *Publicado como: D. Guillen, I Bobolea, Oscar Calderon, Ana Fiandor, R Cabañas, Rocío Heredia, Santiago Quirce. Aspirin desensitization in a patient with aspirin exacerbated urticaria and respiratory disease, achieved after treatment with omalizumab. J Invest Allergol Clin Immunol 2015; Vol. 25(2): 133-162.*

- Premio para **la mejor comunicación oral** en el Simposio Nacional de la Vía Respiratoria Única SEAIC Sevilla 2016. Irina Bobolea, Victoria del Pozo, Verónica

Fenotipos y endotipos de asma grave: mecanismos moleculares implicados en la patogénesis y en la desensibilización a aspirina

Sanz, Rosario Cabañas, Ana Fiandor, Santiago Quirce. La desensibilización a aspirina en la enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina: nuevas perspectivas sobre los mecanismos moleculares. Presentado como comunicación oral. Pendiente de publicación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Global Initiative for Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention: NHLBI/WHO workshop report. Bethesda: National Institutes of Health, National Heart, Lung and Blood Institute. Updated 2014. Available at <http://www.ginasthma.com>.
2. Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J* 2014;43(2):343-73.
3. GEMA 4.0 2015. Guía Española para el manejo del asma. Available at <http://www.gemasma.com>.
4. Cisneros Serrano C, Melero Moreno C, Almonacid Sánchez C, Perpiñá Tordera M, Picado Valles C, Martínez Moragón E et al. Guidelines for severe uncontrolled asthma. *Arch Bronconeumol* 2015; 51(5):235-46.
5. Urrutia I, Aguirre U, Sunyer J, Plana E, Muniozguren N, Martínez J, et al. Changes in the prevalence of asthma in the Spanish cohort of the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS-II). *Arch Bronconeumol* 2007; 43(8): 425-30.
6. García-Marcos L, Quirós AB, Hernandez GC, Guillén-Grima F, Díaz CG, Ureña IC, et al. Stabilization of asthma prevalence among adolescents and increase among schoolchildren (ISAAC phases I and III) in Spain. *Allergy* 2004; 59(12):1301-7.
7. Demoly P, Annunziata K, Gubba E, Adamek L. Repeated cross-sectional survey of patient-reported asthma control in Europe in the past 5 years. *Eur Respir Rev* 2012; 21: 66-74.
8. Olaguibel JM, Quirce S, Juliá B, Fernández C, Fortuna AM, Molina J, Plaza V; MAGIC Study Group. Measurement of asthma control according to Global Initiative for Asthma guidelines: a comparison with the Asthma Control Questionnaire. *Respir Res* 2012; 13:50.
9. Quirce S, Bobolea I, Barranco P. Emerging drugs for asthma. *Expert Opin Emerg Drugs* 2012; 17:219-37.
10. Muñoz-Cano RM, Barranco-Sanz P, Gimenez-Romero MJ. Epidemiología y etiopatogenia del asma. En: Dávila González IJ, Jáuregui Presa I, Olaguibel Rivera JM, Zubeldia Ortuño JM, eds. *Tratado de Alergología*. Madrid: Ergon; 2015. p 595-605.

11. Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med* 2012;18(5): 673-83.
12. Álvarez MJ, Olaguibel JM, García BE, Rodríguez A, Tabar AI, Urbiola E. Airway inflammation in asthma and perennial allergic rhinitis. Relationship with nonspecific bronchial responsiveness and maximal airway narrowing. *Allergy* 2000;55(4):355-62.
13. Szczeklik, A, Stevenson, DD. Aspirin-induced asthma: advances in pathogenesis and management. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:5-13.
14. Corrigan CJ, Napoli RL, Meng Q, Fang C, Wu H, Tochiki K, et al. Reduced expression of the prostaglandin E(2) receptor EP2 on bronchial mucosal leukocytes in patients with aspirin-sensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129:1636-46.
15. Sousa AR, Lams BE, Pfister R, Christie PE, Schmitz M, Lee TH. Expression of interleukin-5 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in aspirin-sensitive and non-aspirin-sensitive asthmatic airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:1384-1389.
16. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature* 2008; 454(7203):445-54.
17. Palomares O, Martín-Fontecha M, Lauener R, Traidl-Hoffmann C, Cavkaytar O, Akdis M, et al. Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF- β . *Genes Immun* 2014;15(8):511-20.
18. Izuhara K, Arima K, Ohta S, Suzuki S, Inamitsu M, Yamamoto K. Periostin in allergic inflammation. *Allergol Int* 2014;63(2):143-51.
19. Elliot JG, Jones RL, Abramson MJ, Green FH, Mauad T, McKay KO, et al. Distribution of airway smooth muscle remodelling in asthma: relation to airway inflammation. *Respirology* 2015 Jan;20(1):66-72.
20. Berair R, Brightling CE. Asthma therapy and its effect on airway remodelling. *Drugs*. 2014 ;74(12):1345-69
21. Sippel JM, Holden WE, Tilles SA, O'Hollaren M, Cook J, Thukkani N, et al. Exhaled nitric oxide levels correlate with measures of disease control in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106(4):645-50.
22. Smith AD, Cowan JO, Brassett KP, Filsell S, McLachlan C, Monti-Sheehan G, et al. Exhaled nitric oxide: a predictor of steroid response. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172(4):453-9.

23. Green RH, Brightling CE, McKenna S, Hargadon B, Parker D, Bradding P, et al. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360(9347):1715-21.
24. Zhang XY, Simpson JL, Powell H, Yang IA, Upham JW, Reynolds PN, et al. Full blood count parameters for the detection of asthma inflammatory phenotypes. *Clin Exp Allergy* 2014;44(9):1137-45.
25. Jia G, Erickson RW, Choy DF, Mosesova S, Wu LC, Solberg OD, et al. Bronchoscopic Exploratory Research Study of Biomarkers in Corticosteroid-refractory Asthma (BOBCAT) Study Group. Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130(3):647-54.
26. Wagener AH, de Nijs SB, Lutter R, et al. External validation of blood eosinophils, FE(NO) and serum periostin as surrogates for sputum eosinophils in asthma. *Thorax*. 2015; 70(2): 115-20.
27. Hanania NA, Wenzel S, Rosén K, Hsieh HJ, Mosesova S, Choy DF, et al. Exploring the effects of omalizumab in allergic asthma: An analysis of biomarkers in the EXTRA study. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187(8):804-11.
28. Nair P, Pizzichini MM, Kjarsgaard M, Inman MD, Efthimiadis A, Pizzichini E, et al. Mepolizumab for prednisone-dependent asthma with sputum eosinophilia. *N Eng J Med* 2009; 360:985-93.
29. Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, Gupta S, Monteiro W, Sousa A, et al. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. *N Eng J Med* 2009; 360: 973-84
30. Castro M, Mathur S, Hargreave F, Boulet LP, Xie F, Young J, et al. Res-5-0010 Study Group. Reslizumab for poorly controlled, eosinophilic asthma: a randomized, placebo-controlled study. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184:1125-32.
31. Wenzel S, Ford L, Pearlman D, Spector S, Sher L, Skobieranda F, et al. Dupilumab in persistent asthma with elevated eosinophil levels. *N Engl J Med* 2013; 368: 2455-66.
32. Laviolette M, Gossage DL, Gauvreau G, Leigh R, Olivenstein R, Katial R, et al. Effects of benralizumab on airway eosinophils in asthmatic patients with sputum eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132: 1086-96.
33. Quirce S, Bobolea I, Domínguez-Ortega J, Barranco P. Future biologic therapies in asthma. *Arch Bronconeumol* 2014; 50(8):355-61.

34. Agustí A. The path to personalised medicine in COPD. *Thorax*. 2014 Sep; 69(9):857-64.
35. Lötvald J, Akdis CA, Bacharier LB, Björner L, Casale TB, Custovic A, et al. Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127:355-60.
36. Gibson PG. Inflammatory phenotypes in adult asthma: clinical applications. *Clin Respir J* 2009; 3: 198–206.
37. Drews AC, Pizzichini MM, Pizzichini E, Pereira MU, Pitrez PM, Jones MH et al. Neutrophilic airway inflammation is a main feature of induced sputum in nonatopic asthmatic children. *Allergy* 2009; 64:1597–1601.
38. Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med*. 2012; 18: 716-25.
39. Wang F, He XY, Baines KJ, Gunawardhana LP, Simpson JL, Li F, et al. Different inflammatory phenotypes in adults and children with acute asthma. *Eur Respir J* 2011; 38(3):567-74.
40. Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, Jia G, et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009; 180:388–95.
41. Kraft M. Asthma phenotypes and interleukin-13 – Moving closer to personalized medicine. *N Engl J Med*. 2011;365:1141-1144.
42. Dweik RA, Boggs PB, Erzurum SC, Irvin CG, Leigh MW, Lundberg JO, et al. An official ATS clinical practice guideline: interpretation of exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 de septiembre de 2011;184(5):602-15.
43. Moore WC, Meyers DA, Wenzel SE, Teague WG, Li H, Li X, et al. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181(4):315-23.
44. Hastie AT, Moore WC, Meyers DA, Vestal PL, Li H, Peters SP, et al. Analyses of asthma severity phenotypes and inflammatory proteins in subjects stratified by sputum granulocytes. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(5):1028-36.

45. Moore WC, Hastie AT, Li X, et al; National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133 (6): 1557-63.
46. Simpson JL, Grissell TV, Douwes J, Scott RJ, Boyle MJ, Gibson PG. Innate immune activation in neutrophilic asthma and bronchiectasis. *Thorax* 2007;62(3):211-8.
47. Dejager L, Dendoncker K, Eggermont M, Souffriau J, Van Hauwermeiren F, Willart M, et al. Neutralizing TNF α restores glucocorticoid sensitivity in a mouse model of neutrophilic airway inflammation. *Mucosal Immunol* 2015;8(6): 1212-25.
48. Woodruff PG, Boushey HA, Dolganov GM, Barker CS, Yang YH, Donnelly S, et al. Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:15858-15863.
49. Agache I, Akdis CA. Endotypes of allergic diseases and asthma: An important step in building blocks for the future of precision medicine. *Allergol Int* 2016;65(3):243-52.
50. McKenzie ANJ. Type-2 innate lymphoid cells in asthma and allergy. *Ann Am Thorac Soc*. 2014;11 (Suppl 5):S263-S270.
51. Voehringer D, Reese TA, Huang X, Shinkai K, Locksley RM. Type 2 immunity is controlled by IL-4/IL-13 expression in hematopoietic non-eosinophil cells of the innate immune system. *J Exp Med*. 2006;203:1435-1446.
52. Barlow JL, McKenzie AN. Type-2 innate lymphoid cells in human allergic disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2014;14:397-403.
53. Smith SG, Chen R, Kjarsgaard M, Huang C, Oliveria JP, O'Byrne PM, et al. Increased numbers of activated group 2 innate lymphoid cells in the airways of patients with severe asthma and persistent airway eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137:75-86.e8.
54. Ray A, Oriss TB, Wenzel SE. Emerging molecular phenotypes of asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015;308(2):L130-40.
55. J Dominguez, I Bobolea, S Quirce. Síndrome de Fernand Widal (ASA-triada). En: 100 síndromes en Alergia e Inmunología clínica (Fascículo 2). R. Pelta Fernandez Ed. INYECCION SLU 2013: ISBN 978-84-695-9275-5: 24-26.

56. I Bobolea, J Quiralte. Enfermedad respiratoria exacerbada por antiinflamatorios no esteroideos. En: Asma Grave. P Barranco, S Quirce Eds. Luzan 5 S.A. 2013: ISBN 978-84-7989-759-8: 131-50.
57. Jenkins K, Costello J, Hodge L. Systematic review of prevalence of aspirin-induced asthma and its implications for clinical practice. *BMJ* 2004;328:434-7.
58. Toledano Muñoz A, HPC, Navas Molinero C, García Simal M, Navarro Cunchillos M, Galindo Campillo AN. Estudio epidemiológico en pacientes con poliposis nasal. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2008;59:438-43.
59. Quiralte J, Blanco C, Delgado J, Ortega N, Alcantára M, Castillo R, et al. Challenge-based clinical patterns of 223 Spanish patients with nonsteroidal anti-inflammatory-drug-induced-reactions. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2007;17:182-8.
60. Berges-Gimeno MP, Simon RA, Stevenson DD. The natural history and clinical characteristics of aspirin exacerbated respiratory disease. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002;89:472-8.
61. Szczeklik A, Nizankowska E, Duplaga M. Natural history of aspirin-induced asthma. AIANE Investigators, European Network on Aspirin-Induced Asthma. *Eur Resp J* 2000;16:432-6.
62. Stevenson DD, Szczeklik A. Clinical and pathologic perspectives on aspirin sensitivity and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:773-86.
63. Van Zele T, Claeys S, Gevaert P, Van Maele G, Holtappels G, Van Cauwenberge P, et al. Differentiation of chronic sinus diseases by measurement of inflammatory mediators. *Allergy* 2006;61:1280-9.
64. Sanak M, Pierzchalska M, Bazan-Socha S, Szczeklik A. Enhanced expression of the leukotriene C4 synthase due to overactive transcription of a fan allelic variant associated with aspirin intolerant asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23:290-6.
65. Sousa A, Parikh A, Scadding G, Corrigan CJ, Lee TH. Leukotriene receptor expression on nasal mucosa inflammatory cells in aspirin sensitive rhinosinusitis. *N Engl J Med* 2002;347:1493-9.
66. Micheletto C, Tognella S, Visconti M, Trevisan F, dal Negro RW. Changes in urinary LTE₄ and nasal function following nasal provocation tests with ASA-tolerant and intolerant asthmatics. *Respir Med* 2006;100:2144-50.

67. Sestini P, Arnetti L, Gambaro G, Peroni MG, Refini RM, Sala A, et al. Inhaled PGE2 prevents aspirin-induced bronchoconstriction and urinary LTE4 excretion in aspirin sensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153: 572-5.
68. Dekker JW, Nizankowska E, Schmitz-Schumann M, Pile K, Bochenek G, Dyczek A, et al. Aspirin induced asthma and HLA-DRB1 and HLA.DPB1 genotypes. *Clin Exp Allergy* 1997;27:574-7.
69. Choi JH, Lee KW, Oh HB, Lee KJ, Suh YJ, Park CS, et al. HLA association in aspirin intolerant asthma: DPB1* 0301 as a strong marker in a Korean population. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:562-4.
70. Kim SH, Jeong HH, Cho BY, Kim M, Lee HY, Lee J, et al. Association of four-locus gene interaction with aspirin intolerant asthma in Korean asthmatics. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 28:336-42.
71. Rhinoconjunctivitis Committee, Spanish Society of Allergy and Clinical Immunology; Rhinology and Allergy Commission, Spanish Society of Otorhinolaryngology. SEAIC-SEORL. Consensus Document on Nasal Polyposis. POLINA Project. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2011;21: Suppl. 1.
72. Nizankowska-Mogilmicka E, Bochenek G, Mastalerz L, Swierczynska M, Picado C, Scadding G, et al.. EAACI/GA2LEN guideline: aspirin provocation tests for diagnosis of aspirin hypersensitivity. *Allergy* 2007;62:1111-8.
73. Nizankowska E, Bestynska-Krypel A, Cmiel A, Szczeklik A. Oral and bronchial provocation tests with aspirin for diagnosis of aspirin-induced asthma. *Eur Respir J* 2000;15:863-9.
74. Kowalski ML, Makowska JS, Blanca M, Bavbek S, Bochenek G, Bousquet J, et al. Hypersensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) – classification, diagnosis and management: review of the EAACI/ENDA and GA2LEN/HANNA. *Allergy* 2011; 66:818–29.
75. Bousquet, J, Van Cauwenberge, P, Khaltaev, N. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:S147-334.
76. Verbruggen K, van Cauwenberge P, Bachert C. Anti-IgE for the treatment of allergic rhinitis and eventually nasal polyps? *Int Arch Allergy Immunol* 2009; 148(2): 87–98.
77. Vennera Mdel C, Picado C, Mullol J, Alobid I, Bernal-Sprekelsen M. Efficacy of omalizumab in the treatment of nasal polyps. *Thorax*. 2011;66:824-5.

78. Gevaert P, et al. Omalizumab is effective in allergic and nonallergic patients with nasal polyps and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:110-116.
79. Stevenson DD. Aspirin desensitization in patients with AERD. *Clin Rev Allergy Immunol* 2003;24:159-67.
80. Berges-Gimeno MP, Simon RA, Stevenson DD. Long-term treatment with aspirin desensitization in asthmatic patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:180-6.
81. Hope A, Woessner KA, Simon R, Stevenson DD. Rational approach to aspirin dosing during oral challenge and desensitization of patients with aspirin- exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:406-10.
82. Rachel U. Lee, Donald D. Stevenson. Aspirin-exacerbated respiratory disease: Evaluation and Management. *Allergy Asthma Immunol Res* 2011;3:3-10.
83. Szefer SJ, Wenzel S, Brown R, Erzurum SC, Fahy JV, Hamilton RG, et al. Asthma outcomes: biomarkers. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129 Suppl 3:S9-23.
84. Parulekar AD, Diamant Z, Hanania NA. Role of T2 inflammation biomarkers in severe asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2016;22(1):59-68.
85. Lane C, Knight D, Burgess S, Franklin P, Horak F, Legg J, et al. Epithelial inducible nitric oxide synthase activity is the major determinant of nitric oxide concentration in exhaled breath. *Thorax* 2004; 59(9): 757-60.
86. Wysocki K, Park SY, Bleecker E, Busse W, Castro M, Chung KF, et al. Characterization of factors associated with systemic corticosteroid use in severe asthma: data from the Severe Asthma Research Program. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133(3):915-8.
87. Fahy JV, Wong H, Liu J, Boushey HA. Comparison of samples collected by sputum induction and bronchoscopy from asthmatic and healthy subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152(1):53-8.
88. Djukanović R, Sterk PJ, Fahy JV, Hargreave FE. Standardised methodology of sputum induction and processing. *Eur Respir J. Suppl* 2002; 37:S1-2.
89. Efthimiadis A, Spanevello A, Hamid Q, Kelly, MM, Linden M, Louis R et al. Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridisation. *Eur Respir J* 2002;20(suppl 37):S19–S23.

90. Pizzichini E, Pizzichini M, Efthimiadis A, Evans S, Morris M, Squillace D, et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:308-17.
91. Belda J, Leigh R, Parameswaran K, O'Byrne PM, Sears MR, Hargreave FE. Induced sputum cell counts in healthy adults. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:475-8.
92. Takeshita S, Kikuno R, Tezuka K, Amann E. Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. *Biochem J* 1993; 294 (Pt 1):271 -278.
93. Kudo A. Periostin in fibrillogenesis for tissue regeneration: periostin actions inside and outside the cell. *Cell mol Life Sci* 2011;68(19):3201-7.
94. Corren J, Lemanske RF, Hanania NA, Korenblat PE, Parsey MV, Matthews JG, et al. Lebrikizumab treatment in adults with asthma. *N Engl J Med* 2011; 365: 1088-98.
95. Matsumoto H. Serum Periostin: a novel biomarker for asthma management. *Allergol Int* 2014; 63(2):153-60.
96. Hoshino M, Ohtawa J, Akitsu K. Effect of treatment with inhaled corticosteroid on serum periostin levels in asthma. *Respirology* 2016; 21(2):297-303.
97. Hoshino M, Ohtawa J, Akitsu K. Association of airway wall thickness with serum periostin in steroid-naïve asthma. *Allergy Asthma Proc* 2016; 37(3):225-30.
98. Li W, et al. Periostin: its role in asthma and its potential as a diagnostic or therapeutic target. *Respiratory Research*.2015; 16(1):57.
99. Leite-de-Moraes M, Hammad H, Dy M. Crosstalk between innate and adaptive cells on allergic process. *J Allergy (Cairo)* 2012; 2012:720568.
100. Oliphant CJ, Barlow JL, McKenzie AN. Insights into the initiation of type 2 immune responses. *Immunology* 2011; 134:378–85.
101. Noben-Trauth N, Hu-Li J, Paul WE. IL-4 secreted from individual naïve CD4 + T cells acts in an autocrine manner to induce Th2 differentiation. *Eur J Immunol* 2002; 32:1428–33.
102. van Panhuys N, Tang SC, Prout M et al. In vivo studies fail to reveal a role for IL-4 or STAT6 signaling in Th2 lymphocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 12423–8.

103. Rael EL, Lockey RF. Interleukin-13 signaling and its role in asthma. *World Allergy Organ J* 2011; 4:54–64.
104. Takayama G, Arima K, Kanaji T et al. Periostin: a novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:98–104.
105. van Rijt L, von Richthofen H, Van Ree R. Type 2 innate lymphoid cells: at the cross-roads in allergic asthma. *Semin Immunopathol* 2016; 38:483–96.
106. Klein Wolterink RG, Kleijjan A, van Nimwegen M et al. Pulmonary innate lymphoid cells are major producers of IL-5 and IL-13 in murine models of allergic asthma. *Eur J Immunol* 2012; 42:1106–16.
107. Friend SL, Hosier S, Nelson A, Foxworthe D, Williams DE, Farr A. A thymic stromal cell line supports in vitro development of surface IgM+ B cells and produces a novel growth factor affecting B and T lineage cells. *Exp Hematol* 1994; 22: 321–328.
108. Sims JE, Williams DE, Morrissey PJ, Garka K, Foxworthe D, Price V et al. Molecular cloning and biological characterization of a novel murine lymphoid growth factor. *J Exp Med* 2000; 192: 671–680
109. Leonard WJ. TSLP: finally in the limelight. *Nat Immunol* 2002; 3: 605–607.
110. Al Shami A, Spolski R, Kelly J, Keane-Myers A, Leonard WJ. A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model. *J Exp Med* 2005; 202: 829–839.
111. Zhou B, Comeau MR, De Smedt T, Liggitt HD, Dahl ME, Lewis DB et al. Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice. *Nat Immunol* 2005; 6: 1047–1053.
112. Ying S, O'Connor B, Ratoff J, Meng Q, Mallett K, Cousins D et al. Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *J Immunol* 2005; 174: 8183–8190.
113. Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Homey B et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 2002; 3: 673–680.
114. Steinke JW, et al. Prominent role of INF- γ in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:856-865

115. Steinke JW, Borish L. Factors driving the aspirin exacerbated respiratory disease phenotype. *Am J Rhinol Allergy* 2015;29:35-40
116. Laidlaw TM, Boyce JA. Pathogenesis of aspirin-exacerbated disease and reactions. *Immunol Allergy Clin N Am* 2013;33:195-210.
117. Cahill K, Bensko JC, Boyce JA, Laidlaw TM. Prostaglandin D(2): A Dominant Mediator Of Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 135:245-52
118. Cianferoni A, Spergel J. The importance of TSLP in allergic disease and its role as a potential therapeutic target. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014; 10:1463-74.
119. Haldar P, et al. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 178: 218–224.
120. I Bobolea, S Quirce. Manejo interdisciplinario de la poliposis nasosinusal en la enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina. *Rev Rinol* 2012; 12 (1):40-53.
121. Nasser SMS, Patel M, Bell GS. The effect of aspirin desensitization on urinary leukotriene E4 concentration in aspirin-sensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151: 1326-30.
122. Katial RK, Martucci M, Burnett T, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory-induced inhibition of signal transducer and activator of transcription 6 (STAT-6) phosphorylation in aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(2):579-85.
123. Katial RK, Strand M, Prasertsuntarasai T, Leung R, Zheng W, Alam R. The effect of aspirin desensitization on novel biomarkers in aspirin-exacerbated respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:738-44.
124. Lee JH, Haselkorn T, Borish L, Rasouliyan, L, Chipps BE, Wenzel SE. Risk factors associated with persistent airflow limitation in severe or difficult-to-treat asthma*: insights from the TENOR study. *Chest* 2007;132:1882–1889. .
125. Reddel HK, Taylor DR, Bateman ED, et al. An official American Thoracic Society/ European Respiratory Society statement: asthma control and exacerbations: standardizing endpoints for clinical asthma trials and clinical practice. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:59-99.
126. Vega JM, Badia X, Badiola C, et al. Validation of the Spanish version of the Asthma Control Test (ACT). *J Asthma* 2007; 44: 867 -72.

127. Normativa SEPAR para la realización de espirometría forzada. http://www.separ.es/doc/publicaciones/normativa/normativa_001.pdf.
128. Menzies D, Nair A, Lipworth BJ (2007) Portable nitric oxide measurement. Comparison with the "gold standard" technique. *Chest* 131:410-414.
129. American Thoracic Society Guidelines for methacholine and exercise challenge testing. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161: 309-29.
130. Bobolea I, Barranco P, Del Pozo V, et al. Sputum periostin in patients with different severe asthma phenotypes. *Allergy*. 2015; 70(5):540-6.
131. D. Guillen, Bobolea I, Calderon O, Fiandor A, Cabañas R, Heredia R, Quirce S. Aspirin desensitization in a patient with aspirin exacerbated urticaria and respiratory disease, achieved after treatment with omalizumab. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2015; 25:133-62.
132. Wenzel SE, Busse WW; National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. Severe asthma: lessons from the Severe Asthma Research Program. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 14-21.
133. Moore WC, Bleecker ER, Curran-Everett D, Erzurum SC, Ameredes BT, Bacharier L et al. National Heart, Lung, Blood Institute's Severe Asthma Research Program. Characterization of the severe asthma phenotype by the National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:405-413.
134. Kanemitsu Y, Matsumoto H, Izuhara K, et al. Increased periostin associates with greater airflow limitation in patients receiving inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132:305-312.
135. Pepe C, Foley S, Shannon J, Lemiere C, Olivenstein R, Ernst P et al. Differences in airway remodeling between subjects with severe and moderate asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:544-549.
136. Caswell-Smith R, Hosking A, Cripps T, Holweg C, Matthews J, Holliday M, et al. Reference ranges for serum periostin in a population without asthma or chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Allergy* 2016; 46(10):1303-14.
137. Buchheit KM, Cahill KN, Katz HR, Murphy KC, Feng C, Lee-Sarwar K et al. Thymic stromal lymphopoietin controls prostaglandin D2 generation in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137:1566-1576.e5.

138. Cahill KN, Bensko JC, Boyce JA, Laidlaw TM. Prostaglandin D(2): a dominant mediator of aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135:245-52

ANEXO I. Hoja de recogida de datos Visita basal

[illegible]

ANEXO II. Hoja de recogida de datos Visitas sucesivas post-desensibilización

VISITA*	Identificación del paciente (numero de estudio):
(a los _____ meses de la desensibilización)	Fecha de la visita:

1. SIGUE CON LA DESENSIBILIZACION: SI NO DOSIS

SINO, CAUSA

EFFECTOS ADVERSOS DE LA DESENSIBILIZACIÓN:

TOLERANCIA OTROS AINES:

2. GRAVEDAD Y CONTROL DEL ASMA:

2.1. Asthma Control Questionnaire/ Test (ACQ/ ACT) :

2.2. AQLQ:

2.3. Clasificación gravedad GEMA: Intermitente
Persistente leve
Persistente moderada
Persistente grave

2.4. Clasificación control GINA/ GEMA: Controlada
Parcialmente controlada
No controlada

2.5. Tratamiento actual:

2.6. Exacerbaciones:
Nº exacerbaciones graves/ ciclos corticosteroides sistémicos:
Nº de visitas a urgencias:
Nº de ingresos hospitalarios:
Nº de visitas al médico por asma no programadas:

3. GRAVEDAD Y CONTROL DE LA RINITIS:

Clasificación ARIA:

Según duración: Intermitente Persistente

Según gravedad: Leve
Moderada
Grave

VAS: _____
0 100

Tratamiento:

Cuestionario RQLQ:

Cuestionario RSDI:

Nº de episodios de sinusitis en el año previo:

Recidiva de poliposis (ORL):

ANEXO III. Protocolo detallado de la desensibilización a aspirina

DESENSIBILIZACIÓN A ASPIRINA. PROTOCOLO DEL SERVICIO DE ALERGOLOGÍA, HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ, MADRID.

INDICACIONES/ PACIENTES CANDIDATOS:

La desensibilización está indicada en:

- Aquellos pacientes con enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina (EREA) con síntomas bronquiales no controlados, a pesar del tratamiento óptimo con corticoides inhalados(CI) y antagonistas de receptores de leukotrienos (anti-LT); con rinosinusitis crónica no controlada/múltiples episodios de sinusitis/año o múltiples polipeptomías; con tratamiento crónico con corticosteroides orales (CO);
- En pacientes con EREA que precisen tratamiento con AINE para enfermedades específicas (reumáticas, cardiovasculares: profilaxis primaria o secundaria de enfermedad coronaria, tromboembólica etc.)
- En mujeres con síndrome antifosfolípido y EREA o con urticaria/ angioedema (UAE) por AINE que estén embarazadas o deseen estarlo.

CONTRAINDICACIONES RELATIVAS (ANALIZAR EN CADA CASO RIESGO/BENEFICIO):

- Trastornos de la coagulación(consultar con Hematología)
- Reflujo gastro-esofágico, gastritis, úlcera gastro-duodenal, dispepsia, historia de Hemorragia digestiva.
- Insuficiencia hepática y/o renal
- Edad > 65 años

DONDE SE REALIZA:

- Por norma general, las desensibilizaciones se realizan en el Hospital de Día de Alergia.

- VALORAR ingreso en REA para llevar a cabo la desensibilización si: ASMA GRAVE CON FEV1<70%, TRATAMIENTO CON BETA-BLOQUEANTES, REACCIONES SEVERAS CON AINE, IAM RECIENTE, PACIENTES ANTICOAGULADOS (no se puede administrar adrenalina im, habrá que poner adrenalina iv si fuese necesario).
- Las desensibilizaciones urgentes se llevarán a cabo en la Unidad de Vigilancia Intensiva donde esté ingresado el paciente, sea Unidad de Ictus o Coronarias (desplazamiento médico, enfermera).

PROTOCOLO DE DESENSIBILIZACIÓN EN PACIENTES CON EREA

1. VALORAR LA ESTABILIDAD DE LA VÍA AEREA UNA SEMANA ANTES DE INICIAR LA DESENSIBILIZACIÓN:

- Mediciones del FEV1 /hora durante 3 horas; Si hay<10% variabilidad se considera estable.
- CONDICIÓN MÍNIMA antes de iniciar el procedimiento: FEV1>60% teórico, >90% del mejor previo, y >1,5 l.
- No retirar la medicación habitual: mantener o iniciar montelukast
- Iniciar un ciclo de CO si FEV1 bajo/inestable.
- En pacientes en tratamiento crónico con CO duplicar la dosis hasta finalizar la desensibilización.
- Suspender los antihistaminicos (anti-H1) 48 horas antes.

2. REQUISITOS OBLIGATORIOS PARA EMPEZAR:

- Firma del consentimiento informado.
- Una via periférica heparinizada
- Disponer de monitor ECG, TA, SaO2
Espirometro
- Carro de parada y monitor-desfibrilador a pie de cama.
- Personal sanitario altamente calificado para monitorizar y tratar las reacciones(médico, enfermero/a)

3. TODOS LOS DIAS DE LA DESENSIBILIZACIÓN:

- Administrar Omeprazol 20 mg/24 h vía oral
- Realizar exploración física y FEV1 iniciales y cada hora o si síntomas
- Se administra aspirina a dosis creciente con intervalo de 3 horas entre las dosis
- Positividad si el FEV1 disminuye >15%, y/o aparecen síntomas oculares, nasales, sistémicos.
- Generalmente positividad en torno a 61 /81mg, lo que se denomina dosis reactiva.
- Tratado y estabilizado el paciente se repite dosis reactiva, no antes de las 3 horas de la reacción (ese día o el día siguiente).
- SI DESCENSO DEL FEV1 >15% mantenido más de 3 horas, se para la desensibilización hasta el día siguiente, empezando entonces por la ultima dosis previamente tolerada (la dosis anterior a la dosis reactiva).
- Si con dosis reactiva aparecen de nuevo síntomas, se repite hasta tolerancia y luego se continúa ascenso hasta 325mg.

4. ASPIRINA utilizada:

- Comprimidos de 100, 300, 500 mg.
- Se administra según la siguiente pauta:

DÍA 1: 25 y 50 mg

DÍA 2: 75 y 100 mg

DÍA 3: 150 y 325mg

DÍA 4: 650 mg

DOSIS DEMANTENIMIENTO: 650mg/12h el primer mes. Si bien al mes reducir a 325mg/12h (si desaparece la congestión nasal y recupera el olfato). Si el paciente está tomando corticoides orales, reducir la dosis de éstos últimos antes de bajar la AAS. Si reaparece la congestión nasal, volver a subir luego la dosis de AAS: Reducir luego cada mes para que al final cada paciente mantenga la dosis mínima de aspirina diaria que le controle los síntomas.